

Biomembranen an Grenzflächen und in synaptischer Geometrie

- eine Computersimulation -

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Volker Binding
aus Köln

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. R. Kree

Koreferentin: Prof. Dr. A. Zippelius

Tag der mündlichen Prüfung: 1. November 2000

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Informationsfluß im zentralen Nervensystem	3
1.2	Biomembranen	3
1.3	Inhomogene Ionenkanalverteilungen	5
1.4	Elektrophysiologische Methoden	8
1.5	Musterbildung in biologischen Systemen	10
2	Das Modell	12
2.1	Grundprinzipien	12
2.2	Ionenkanäle ohne Schaltverhalten	14
2.3	Spannungsabhängige Ionenkanäle	14
2.4	Liganden-aktivierte Ionenkanäle	16
2.5	Zweidimensionale Kabelgleichung	19
2.6	Dynamik von Ionenkanälen in einer fluiden Membran	22
3	Lösen des Gleichungssystems	23
3.1	Der Algorithmus	23
3.2	Lösen der Langevingleichung mit der stochastischen Eulermethode . .	24
3.3	Lösen der Diffusionsgleichung für den Neurotransmitter	24
3.4	Lösen der zweidimensionalen Kabelgleichung mit der Überrelaxations- methode	25
4	Computersimulationen von Ionenkanälen in einer Membran	27
4.1	Immobile, spannungsabhängige Systeme	27
4.2	Liganden-aktivierte Kanäle, synaptische Kontakte	34
4.3	Musterbildung in Systemen mit zeitlich konstantem Antrieb	37
4.4	Musterbildung in Systemen mit zeitlich periodischem Antrieb im <i>Patch</i>	42
4.5	Musterbildung im Röhrensegment	46
5	Fluidität und Zytoskelett	51
6	Biomembranen in natürlichem Gewebe	53

7	Biomembranen an künstlichen Oberflächen	56
8	CA3-Synapsen	57
9	Zusammenfassung und Ausblick	58
9.1	Zusammenfassung	58
9.2	Meßtechnik	58
9.3	Modellerweiterung	59
10	Literatur	60

1 Einleitung

1.1 Informationsfluß im zentralen Nervensystem

Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist eine Ansammlung von miteinander verknüpften Nervenzellen, die kontinuierlich Information empfangen, analysieren und weitergeben, die lernen und Entscheidungen treffen. Andererseits kann das Gehirn auf Sinnesorgane einwirken und diese regulieren. Um Informationen in den Rest des Körpers weiterzuleiten, besitzt das Nervensystem eine große Anzahl von Datenleitungen (Neurone). Diese Zellen sind die Bausteine des Gehirns.

Zwischen den Nervenzellen bestehen Netzwerk-artig dynamische Verknüpfungen (Synapsen), die in ihrer Übertragungsfunktion veränderlich sind. So kann im Netzwerk sowie in einzelnen Zellen Information gespeichert werden. Es gibt verschiedene Hypothesen, auf welche Weise dies geschehen kann (siehe Abschnitt 1.3.2).

Unser Gehirn bedient sich elektrischer Signale, um Informationen zu empfangen, zu analysieren und auszusenden. Einzelne Nervenzellen können komplexe Information in einfache elektrische Signale umwandeln. Die Signale ihrerseits bestehen aus Potentialschwankungen, die durch Stromfluß über die Zellmembran hervorgerufen werden. Die Ströme werden von verschiedenen Ionen wie z. B. Natrium- oder Kaliumionen getragen.

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Potentialschwankungen: Lokale Potentiale, die nur eine Reichweite von 1 bis 2 mm haben, spielen bei der synaptischen Übertragung eine Rolle. Diese erlauben die Auslösung von Aktionspotentialen.

Aktionspotentiale sind kurze Spannungspulse, die sich mit hoher Geschwindigkeit über große Distanzen ausbreiten und so einen schnellen Informationsaustausch zwischen Gehirn und Rest des Körpers bewirken.

1.2 Biomembranen

Jede Zelle ist von einer Biomembran umgeben, welche Kompartimentierung in biologischen Systemen ermöglicht. Ihre Grundstruktur besteht aus einer Lipid-Doppelschicht. Die Anzahl der Lipidmoleküle, die ein Membranstück von $1 \mu m^2$ bilden, beträgt ungefähr $5 \cdot 10^6$. Die Lipide sind durch nicht-kovalente Bindungen untereinander verbunden, sodaß eine Lipidmembran fluide ist und damit als zweidimensionale Flüssigkeit

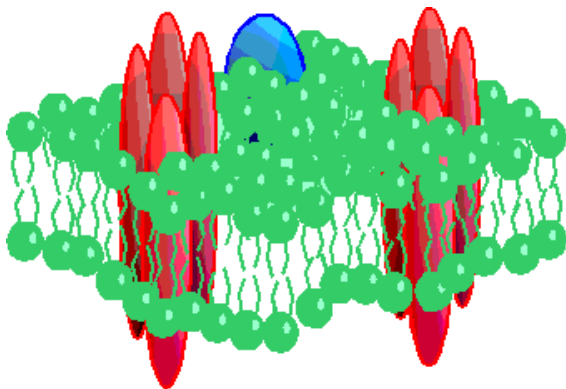
betrachtet werden kann (Alberts *et al.* 1994). In einer Biomembran kann es durch die Kopplung von Membranproteinen an ein dicht unter der Membran liegendes Zytoskelett zu Einschränkungen in der Fluidität kommen, indem sich Domänengrenzen zwischen fluiden Bereichen der Membran bilden (Kusumi und Sako 1996).

In natürlichem Gewebe haben Zellmembranen benachbarter Zellen unter Umständen sehr geringe Abstände zueinander. Der Abstand zwischen dem Axon eines Neurons und der es elektrisch isolierenden Umhüllung einer Schwann-Zelle beträgt nur wenige *nm* (Alberts *et al.* 1994). In der Nähe von *gap junctions*, d. h. speziellen Verbindungen zwischen Zellen, kann der Abstand der Plasmamembranen 2 bis 4 *nm* betragen (Zigmond *et al.* 1999). In einer Synapse im ZNS liegt der typische Abstand zwischen Prä- und Postsynapse zwischen 10 und 20 *nm* (Edwards 1995).

In neueren Experimenten läßt man Zellmembranen sehr dicht auf künstlichen Oberflächen wie Siliziumoxid aufwachsen, um mit Zellen kapazitiv über den schmalen Spalt zwischen Oberfläche und Membran zu kommunizieren (Fromherz und Stett 1995).

Üblicherweise betrachtet man die physikalischen und physiochemischen Eigenschaften von Biomembranen unter Vernachlässigung der Phänomene, die sich aus dem engen Kontakt von Zellen zueinander oder zu ihrer unmittelbaren Umgebung ergeben. Dieser spielt in dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell eine Schlüsselrolle.

A



B

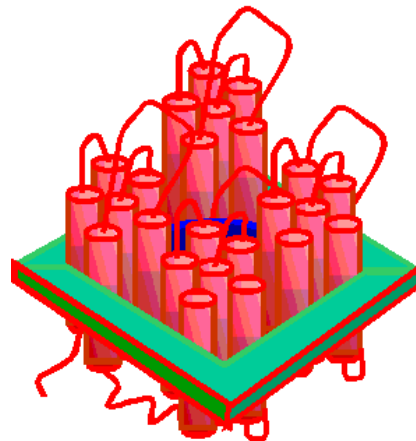


Abbildung 1.1: A: schematischer Aufbau einer Membran nach Alberts *et al.* 1994, B: Aufbau des spannungsgesteuerten Natriumkanals aus 4 Untereinheiten zu je 6 Segmenten nach Nicholls *et al.* 1992.

Abbildung 1.1 A zeigt schematisch den Aufbau einer Biomembran aus Lipiden und verschiedenen Proteinen. Die Proteine können auf einer Seite in die Membran eingebettet sein oder diese durchdringen. Sie nehmen unterschiedliche Funktionen wahr.

Ionen können die Membran nicht ohne weiteres durchdringen, da diese zwar an den Außenseiten hydrophil ist, aber einen zentralen hydrophoben Bereich besitzt, welcher für Ionen eine hohe Energiebarriere darstellt (Anderson 1978). Unter anderem sind zwei Kategorien porenbildender Transmembranproteine bekannt, die Ionendurchtritt erlauben: Ionenpumpen (aktive Poren), die Ionen entgegen ihres elektrochemischen Gradienten über die Membran pumpen und mehr oder weniger selektive Ionenkanäle (passive Poren), die Ionen in Richtung ihres elektrochemischen Gradienten passieren lassen. Ionenkanäle bestehen in der Regel aus verschiedenen Untereinheiten, die ihrerseits eine Kette von unterschiedlichen Transmembransegmenten beinhalten. Der spannungsabhängige Natriumkanal beispielsweise besteht aus 4 Untereinheiten mit jeweils ca. 600 Aminosäuren (Abb. 1.1 B nach Nicholls *et al.* 1992). Die Untereinheiten formen eine Röhre durch die Membran, die für Ionen durchlässig ist.

1.3 Inhomogene Ionenkanalverteilungen

Ionenkanäle und -pumpen sind in Zellmembranen im allgemeinen nicht homogen verteilt. Als Beispiel für inhomogene Verteilungen auf einer Skala von bis zu 100 μm wird in Abschnitt 1.3.1 das olfaktorische Neuron behandelt und in Abschnitt 1.3.2 als Beispiel für inhomogene Kanalverteilungen im Submikrometerbereich die Synapse.

1.3.1 Olfaktorisches Neuron

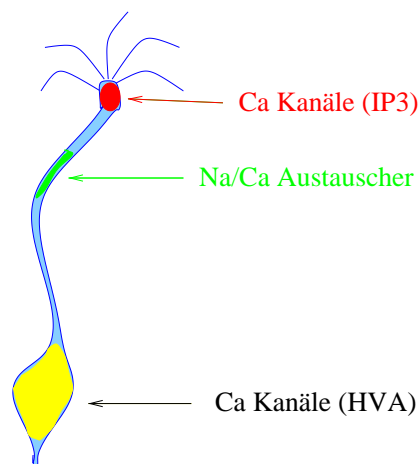


Abbildung 1.2: Verteilung verschiedener Kalziumkanäle und des Natrium-Kalzium-Austauschers in einem olfaktorischen Neuron.

Abbildung 1.2 stellt den Axonansatz, Zellkörper (*soma*), Dendriten und dendritisches Knöpfchen einer olfaktorischen Nervenzelle dar. Die im dendritischen Knöpf-

chen mündenden Härchen (Zilien) ragen in die Nasenschleimhaut hinein, wo sie in Kontakt zu Duftstoffen kommen. Der Kontakt eines Duftstoffes mit auf den Zilien sitzenden Rezeptoren löst eine Übertragungskaskade im Inneren der Zelle aus, die schließlich zur Auslösung eines Aktionspotentials am Axon der Zelle führt. Elektro-physiologische Messungen in Zusammenhang mit optischen Kalziumkonzentrationsmessungen haben gezeigt, daß Liganden-gesteuerte Kalziumkanäle im dendritischen Knöpfchen und spannungsgesteuerte Kalziumkanäle im Zellkörper zu finden sind (Schild *et al.* 1994, Schild und Lischka 1994). Die beiden Zellbereiche sind elektrochemisch durch Natrium-Kalzium-Austauscher, die sich auf der Plasmamembran des Dendriten befinden, getrennt (Jung *et al.* 1994), sodaß die Kalziumkonzentrationen in dendritischem Knöpfchen und Zellkörper weitgehend unabhängig voneinander eingestellt oder verändert werden können.

1.3.2 Synapsen

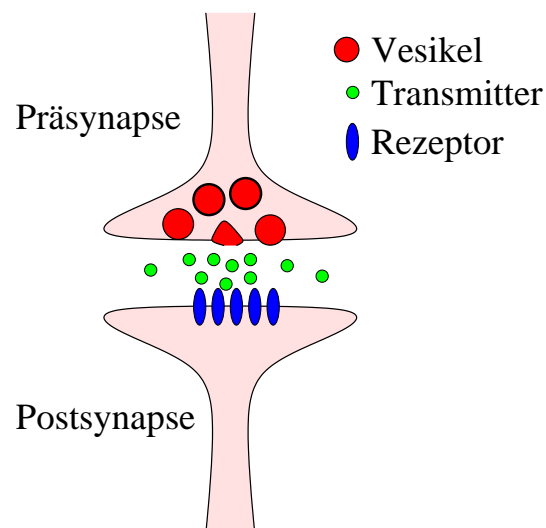


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau einer chemischen Synapse.

Als Beispiel für inhomogene Kanalverteilungen in Systemen, die einen schmalen Spalt zwischen zwei Zellmembranen beinhalten, werden im folgenden chemische Synapsen betrachtet. Neuronen kommunizieren untereinander über Synapsen. Das Axon des einen Neurons stellt eine Beziehung zu einem Dendriten eines anderen Neurons her, indem sich dort eine Synapse ausbildet. Synapsen können sehr unterschiedliche Formen annehmen (Walmsley *et al.* 1998, Edwards 1995). Ein elektrisches Signal (Aktionspotential) im Axon wird in der Präsynapse in ein chemisches Signal umgewandelt, indem die elektrische Reizung in der Präsynapse einen Kalziumioneneinstrom verursacht (Zucker and Haydon 1988), der seinerseits die Ausschüttung eines

Neurotransmitters wie z.B. Acetylcholin (ACh) oder Glutamat aus Vesikeln in den synaptischen Spalt zwischen Prä- und Postsynapse bewirkt (Abb. 1.3). Der Neurotransmitter diffundiert durch den schmalen Spalt und bindet an in der Postsynapse befindliche Rezeptoren, was schließlich eine Änderung in der Membranleitfähigkeit der Postsynapse bewirkt und somit ein elektrisches Signal (postsynaptisches Potential) generiert (Nakanishi 1994, Walmsley *et al.* 1998).

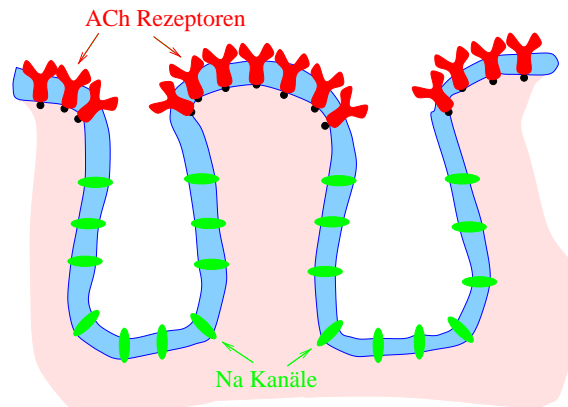


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau der neuromuskulären Endplatte (nach Hall 1992).

Ionenkanäle sind in einer Synapse typischerweise inhomogen verteilt.

In der neuromuskulären Endplatte (Abb. 1.4) befinden sich die ACh-Rezeptoren und die 43-kD-Proteine jeweils an den konvex gewölbten Bereichen der Membran, wohingegen sich die Natriumkanäle und Ankyrin in den konkav gewölbten Bereichen finden lassen (Hall 1992).

In typischen Synapsen des zentralen Nervensystems bilden die Rezeptoren eine postsynaptische Dichte von ca. $(125\text{ nm})^2$. Es befinden sich dort zwischen 50 und 100 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat (AMPA)-Kanälen und ungefähr 10 N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Kanäle dicht beisammen (Zigmond *et al.* 1999). Die AMPA-Kanäle sind Glutamat-aktiviert und nehmen in der oben beschriebenen Weise an der synaptischen Übertragung teil, die NMDA-Kanäle sind ebenfalls Glutamat-aktiviert und überdies spannungsabhängig durch Magnesium blockiert. Eine Depolarisation der Postsynapse hebt den Magnesiumblock der NMDA-Kanäle auf, sodaß bei gleichzeitiger Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt und Depolarisation der Postsynapse die NMDA-Kanäle leitend für Natrium, Kalium- und Kalziumionen werden (Jahr und Stevens 1990, Zigmond *et al.* 1999). Damit ist der NMDA-Kanal ein Sensor in der postsynaptischen Membran für gleichzeitige Aktivierung der Präsynapse und Depolarisation der Postsynapse (Isaac *et al.* 1995, Malenka und Nicoll 1997).

Das Übertragungsverhalten von Synapsen unterliegt reizabhängigen Modulationen.

nen: Mit hoher Frequenz über längere Zeit stimulierte Synapsen verändern ihre Übertragungseigenschaften (Nakanishi 1994, Nicholls *et al.* 1992). Tetanische Reizung, d. h. hochfrequente, über einen längeren Zeitraum (z. B. 15 Reize pro Sekunde, 15 Sekunden lang) durchgeführte Reizung bewirkt eine Erhöhung in der Amplitude des postsynaptischen Potentials, die über Stunden, teilweise sogar über Tage und Wochen anhalten kann (Bliss und Collingridge 1993). Man nennt dieses Phänomen Langzeitpotenzierung (LTP).

Man unterscheidet zwei LTP-Hypothesen: Die homosynaptische LTP zeigt sich in der verstärkten Antwort einer zuvor tetanisch gereizten Synapse, die heterosynaptische LTP in der Verstärkung einer Synapse, deren Postsynapse durch Aktivität des Dendriten bereits depolarisiert ist, während gleichzeitig die Präsynapse erregt wird. Die Postsynapse kann durch synaptische Aktivität weiterer auf diesem Dendriten ansässiger Synapsen depolarisiert werden. Im zentralen Nervensystem kann LTP in der Postsynapse ausgelöst werden (Malinow *et al.* 2000), indem bei gleichzeitiger Aktivierung der Präsynapse und damit Ausschüttung des Neurotransmitters und Depolarisation der Postsynapse Kalziumionen durch NMDA-Kanäle einströmen.

Seit vielen Jahren wird diskutiert, ob die der LTP zugrunde liegenden Modifikationen in der Prä- oder Postsynapse vorgenommen werden (Nicoll und Malenka 1995, Malinow *et al.* 2000). Ein besseres Verständnis des Mechanismus' erlaubt möglicherweise, die Rolle der LTP bei Lernvorgängen bzw. bei Gedächtnisleistungen zu klären.

In vielen Regionen des ZNS werden sogenannte schweigende Synapsen (*silent synapses*) gefunden (Malenka und Nicoll 1997). Diese Synapsen enthalten NMDA-Kanäle in der postsynaptischen Membran, aber keine AMPA-Kanäle. Aus diesem Grunde bewirkt eine präsynaptische Stimulation ohne gleichzeitige Depolarisation der Postsynapse keinen Stromfluß, wenngleich die NMDA-Kanäle eine beidseitig erfolgte Reizung detektieren.

Auf großen Zeitskalen (ab ca. 30 *min*) kommt es in Zusammenhang mit LTP zu morphologischen Veränderungen am postsynaptischen Dendriten (Engert und Bonhoeffer 1999): Auf einem Dendriten, der LTP aufweist, entstehen neue Fortsätze (*spines*), auf denen sich möglicherweise zusätzliche Synapsen ausbilden.

1.4 Elektrophysiologische Methoden

Bei der Untersuchung von Funktion und Verteilung von Membranleitfähigkeiten in natürlichen und naturnahen Systemen war man lange Zeit auf große Zellen angewiesen, die mit einer Elektrode angestochen werden konnten (Hodgkin und Huxley 1952). Auf diese Weise konnten Spannungsgradienten über einer Membran angelegt und Membranströme gemessen werden. Der große Leckwiderstand zwischen Zellinnerem und Zellumgebung an der Einstichstelle und die Größe der Zellmembranen ließen jedoch keine Charakterisierung von einzelnen Ionenkanälen zu. Eine deutliche Verbesserung stellte die Entwicklung der *Patch-Clamp* Technik dar: Hierbei wird eine

an der Spitze sehr dünne Glaspipette (Spitzendurchmesser ca. $0,5\ \mu\text{m}$) so mit einer Zellmembran in Verbindung gebracht, daß sich ein Teil der Membran in die Pipette hineinwölbt. Dadurch wird ein Leckwiderstand zwischen Membran und Pipette in der Größenordnung von 10 bis $30\ \text{G}\Omega$ erreicht (Hamill *et al.* 1981, Neher und Sakmann 1992). Um Aussagen über Membranleitfähigkeiten zu erhalten wird entweder ein konstanter Regelstrom in die Pipette gegeben und die Spannung über der Membran gemessen (*current-clamp*) oder die Spannung zwischen Pipette und Badlösung wird konstant gehalten (*voltage-clamp*) und der dafür notwendige Regelstrom durch die Pipette gemessen. Ein Beispiel einer *voltage-clamp*-Messung ist in Abb. 1.5 dargestellt. Der im letzteren Fall gemessene Strom setzt sich zusammen aus den Strömen durch offene Ionenkanäle, Ionenpumpen, Leckströmen und kapazitiven Komponenten. Kapazitive Membranströme können teilweise von handelsüblichen *Patch-Clamp* Verstärkern kompensiert werden (Neher und Sakmann 1992). Aufgrund des hohen Leckwiderstandes ist es möglich, Transmembranströme von wenigen Picoampere zu detektieren und damit Ströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen.

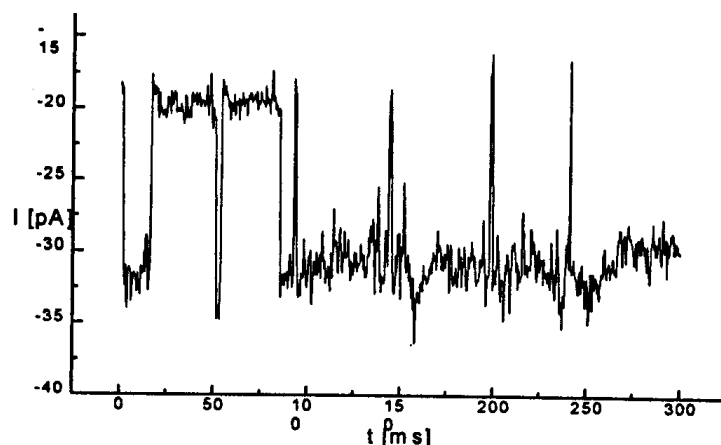


Abbildung 1.5: Stromspur eines Membranfleckens im *voltage-clamp* bei 46 mV. Der *patch* beinhaltet eine große Einzelkanalleitfähigkeit. Oberes Niveau: Kanal geschlossen, unteres Niveau: Kanal offen (Binding, 1997).

Messungen können in unterschiedlichen Meßkonfigurationen durchgeführt werden (Hamill *et al.* 1981, Neher und Sakmann 1992): Die Zelle kann unverletzt als ganzes an der Pipette hängen (*on-cell*-Konfiguration), das Membranstück in der Pipette kann durchschlagen werden, sodaß zwischen Pipette und Zellinnerem eine direkte Verbindung besteht (*whole-cell*-Konfiguration) oder von der Zelle abgelöste Membranflecken (*patches*) verschließen die Pipettenöffnung (*inside-out*- / *outside-out*-Konfiguration). Die *inside-out*- bzw. *outside-out*-Konfiguration eignet sich besonders zur Charakteri-

sierung von Ionenkanälen, da die Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran vorgegeben und intrazelluläre Zwischenschritte weitgehend ausgeschaltet werden können.

Man meint, die Spannung über der Membran in allen Meßkonfigurationen gut kontrollieren zu können. Bei der Interpretation der Strommessungen im *voltage-clamp* wird angenommen, daß die Spannung über der Membran überall bekannt ist. Im allgemeinen wird davon ausgegangen, daß die Spannung auf jeder Membranseite räumlich konstant ist. Somit wäre die treibende Spannung für den Strom durch einen Ionenkanal - bei einem spannungsabhängigen Ionenkanal zusätzlich die Schaltkinetik - unabhängig von der Geometrie des Systems und der Position des Ionenkanals in der Membran. Folglich sollten "geclusterte" Ionenkanäle von nicht "geclusterten" durch ein *voltage-clamp*-Experiment nicht zu unterscheiden sein (bei konstanter Anzahl von Kanälen im Membranflecken).

1.5 Musterbildung in biologischen Systemen

In biologischen Systemen ist Musterbildung auf unterschiedlichen Längenskalen bekannt. So gibt es Effekte auf makroskopischen Längenskalen wie zum Beispiel Fellmusterung (Zebras, Leoparden, Kühe, ... , siehe Murray 1993), sowie im subzellulären Bereich beispielsweise bei der Ausbildung von Proteinmustern auf der Plasmamembran (Lucas 1975, Benke *et al.* 1993).

Viele biologische Systeme weisen während des Wachstums- oder Entwicklungsprozesses autonome Ionenströme auf, die Einfluß auf die Zellentwicklung nehmen (Larter und Ortoleva 1982). Ein gut untersuchtes Beispiel ist das Seegras *Fucus*: Das Einsetzen eines transzellulären Stromes, der die Zelle polarisiert und damit Einfluß auf ihre weitere Entwicklung nimmt, wird durch einen Symmetriebruch in der Morphogenese verursacht (Larter und Ortoleva 1981). Dieser scheint durch räumliche Fluktuationen in der Dichte von Ionenpumpen und -kanälen in der Plasmamembran, insbesondere durch solche für Kalium und Kalzium, ausgelöst zu werden, wobei es durch die laterale Beweglichkeit dieser Proteine ab einer kritischen Zellgröße (1 bis 100 μm) zu einem Selbstverstärkungsprozeß und damit zum Symmetriebruch kommt (Pelce 1993, Denet und Pelce 1994). Die das System antreibende Kraft ist durch den Spannungsgradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum gegeben (Denet und Pelce 1994).

Ein weiteres Beispiel für Musterbildung auf zellulärer Ebene sind die Armleuchteralgen (*Characeae*) *Nitella* und *Chara*. Sie entwickeln ab einer kritischen Länge von ca. 3 mm bei Beleuchtung oberhalb einer kritischen Intensität konzentrische, alternierende Bänder aus sauren und alkalischen Bereichen entlang der Zellwände (Toko *et al.* 1985). Die dieser Bandstrukturbildung zugeordnete Ionenkanalverschiebung auf der Plasmamembran kann als Selbstorganisationsprozeß modelliert werden,

wobei wiederum der Spannungsgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum die treibende Kraft darstellt (Fromherz und Kaiser 1991, Fromherz und Zimmermann 1995, Fromherz 1988b).

Turing-Instabilitäten in Reaktions-Diffusions-Systemen sind in der Lage, Musterbildungsprozesse auf verschiedenen Längenskalen als Bifurkationen zu beschreiben. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen raum-zeitlichen Ordnungsphänomenen und linearen Instabilitäten (Turing 1952). Dabei gilt im einfachsten Fall folgendes Prinzip: Zwei Stoffe A und B, deren raum-zeitliche Konzentrationsänderung jeweils von der lokalen Konzentration des anderen Stoffes abhängt, tendieren ohne Diffusion zu einem linear stabilen uniformen Gleichgewichtszustand. Unter Berücksichtigung des Diffusionstermes mit jeweils unterschiedlichen Diffusionskonstanten für A und B kommt es oberhalb eines kritischen Wertes (in biologischen Systemen z. B. die Temperatur oder räumliche Abmessungen) zur Ausbildung von raum-zeitlich inhomogenen Mustern in der Konzentration der Stoffe durch eine Diffusions-getriebene Instabilität (Turing 1952, Cross und Hohenberg 1993). Dies ist ungewöhnlich, da Diffusion normalerweise zur Stabilisierung eines uniformen Zustandes beiträgt. Es zeigt sich, daß die Musterklasse, also z. B. die Größe und Form von Domänen eines Stoffes, nicht von den Anfangsbedingungen abhängt, sondern von den Randbedingungen wie z. B. der Geometrie des betrachteten Systems. Die Anfangsbedingungen bestimmen innerhalb einer Musterklasse die spezielle Struktur des Musters, beispielsweise wo genau die Domänengrenzen liegen (Murray 1993, Cross und Hohenberg 1993).

In dieser Arbeit wird anhand von Computersimulationen gezeigt, daß für das Antwortverhalten einer Biomembran auf einen elektrischen oder chemischen Reiz die Geometrie und die unmittelbare räumlich begrenzende Umgebung der Membran eine bedeutende Rolle spielen. Unter bestimmten Voraussetzungen kommt es auch hier zu selbstorganisierten Musterbildungsprozessen.

2 Das Modell

2.1 Grundprinzipien

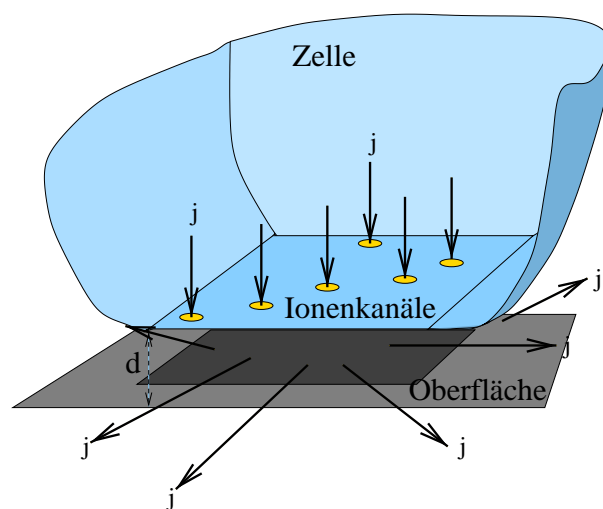


Abbildung 2.1: Stromfluß durch eine Zellmembran dicht an einer Oberfläche: Der durch geöffnete Ionenkanäle fließende Strom muß den schmalen Spalt zwischen Zelle und Oberfläche passieren, bevor er das Bad erreicht. Dadurch wird ein Spannungsabfall im Spalt verursacht.

Das Modell, das der Computersimulation zugrunde liegt, reduziert die Membran auf eine Fläche, die sich dicht (10 nm) an einer zu ihr planparallelen, elektrisch neutralen, nicht leitenden und nicht polarisierbaren Oberfläche oder an einer zweiten bis auf die Ionenkanalverteilung identischen Membran befindet (Abb. 2.1). Zellvolumen und laterale Ausdehnung des Spaltes sind verglichen mit der Spalthöhe groß. Am Rand des Spaltes weitet sich dieser abrupt nach oben und unten auf. An den Rändern des Spaltes zwischen Membran und Oberfläche bzw. zweiter Membran wird das Potential konstant auf 0 mV gehalten, wie es beispielsweise in einem *Patch-clamp*-Experiment durch eine Badelektrode realisiert werden kann. Das Potential auf der intrazellulären Seite der Membran(en) kann frei gewählt werden und ist über die ganze Fläche der Membraninnenseite konstant. Zusätzlich werden Spannungspulse

diesem Haltepotential überlagert, wie es in einem *Patch-clamp*-Experiment mittels einer Patchpipette praktiziert werden kann.

Die Membran wird entweder als fluide angenommen, sodaß sich in ihr befindliche Modellkanäle mit einem Diffusionskoeffizienten D bewegen können (mobiles System), oder die Kanäle werden als an bestimmten Orten z. B. durch ein Zytoskelett fixiert modelliert (immobiles System). Die Membranfläche des mobilen Systems wird zusätzlich durch eine andere Wahl der Randbedingungen (s. u.) als Röhrensegment modelliert, wobei die Krümmung außer acht gelassen wird (Abb. 2.2).

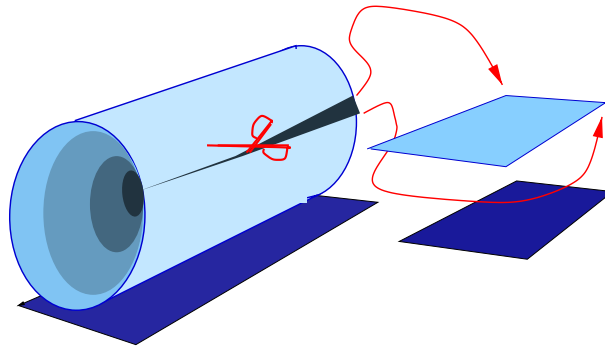


Abbildung 2.2: A: Ein Röhrensegment wird unter Vernachlässigung von Krümmungseffekten als Fläche mit periodischen Randbedingungen in einer Raumrichtung modelliert.

Die Ionenkanäle werden als Kreisscheiben mit endlicher lateraler Ausdehnung beschrieben, die sich nicht durchdringen können. Die Leitfähigkeit selbst sei punktförmig. Die Modellmembran kann unterschiedliche Ionenkanalsorten enthalten. Der einzelne Ionenkanal ist charakterisiert durch seine Einzelkanalleitfähigkeit, sein spezielles Schaltverhalten und seine Ionenselektivität. Letztere beeinflusst das jeweilige Umkehrpotential des Kanals, das sich aus den jeweiligen Nernstspannungen zusammensetzt. Die Ionenkanäle tragen eine elektrophoretische Punktladung (Larter und Ortoleva 1981, Fromherz 1995), mittels der sie an das laterale elektrische Feld im Spalt koppeln, welches sich aufgrund des Stromflusses durch die Kanäle ausbildet (Ohm'sches Gesetz). Die Ionenkanäle können die Membran nicht verlassen. Die Kanalanzahl bleibt erhalten, da keine Kanäle entstehen oder vergehen.

Tabelle 2.1 zeigt eine Aufstellung der betrachteten Systeme, die sich in ihrer Geometrie, Membranfluidität und den beinhalteten Ionenkanalsorten unterscheiden. Mit einem * gekennzeichnete Kanäle haben kein spezielles Schaltverhalten, sondern sind während der gesamten Simulation permanent geöffnet.

Die elektrische Drift und die Diffusion in den mobilen Systemen für insgesamt N Ionenkanäle wird mit einem Satz von N Langevin Gleichungen beschrieben (siehe Abschnitt 2.6). Diese sind über das elektrische Potential gekoppelt, welches von den Positionen aller Ionenkanäle abhängt.

System	Geometrie	Mobilität	Membran(en)	Kanalsorten
A	<i>patch</i>	immobil	1	Natrium- + Kaliumkanäle
B	<i>patch</i>	immobil	1	AMPA-Kanäle
C	<i>patch</i>	immobil	1	NMDA- + AMPA-Kanäle
D	<i>patch</i>	mobil	2	Kationenkanäle*
E	<i>patch</i>	mobil	2	Kaliumkanäle*
F	<i>patch</i>	mobil	2	Chloridkanäle*
G	<i>patch</i>	mobil	1	Natrium- + Kaliumkanäle
H	Röhre	mobil	1	Natrium- + Kaliumkanäle

Tabelle 2.1: Aufstellung der unterschiedlichen betrachteten Systeme. Mit einem * gekennzeichnete Kanäle haben kein spezielles Schaltverhalten, sondern sind während der gesamten Simulation permanent geöffnet.

2.2 Ionenkanäle ohne Schaltverhalten

Es werden Ionenkanäle modelliert, die während der gesamten Simulation permanent geöffnet sind und eine Ohm'sche Strom-Spannungskennlinie haben. Dabei werden Kationenkanäle (Umkehrpotential = 0 mV), Kaliumkanäle (Umkehrpotential = -70 mV) und Chloridkanäle (Umkehrpotential = +70 mV) betrachtet (Tab. 2.2 und Hille 1992). Die Kationenkanäle haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von 20 oder 8 pS , die Kalium- und Chloridkanäle haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von 8 pS (Hille 1992). Ihnen wird eine elektrophoretische Punktladung von 2,5 oder 5 Elementarladungen zugewiesen.

2.3 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Als spannungsabhängige Ionenkanäle werden Natrium- und Kaliumkanäle modelliert. Die elektrischen Eigenschaften der Kanäle sind durch ihr jeweiliges Umkehrpotential, die Einzelleitfähigkeit und ihr spannungsabhängiges Schaltverhalten charakterisiert. Beide Kanalsorten bestehen aus jeweils vier Untereinheiten. Ein Kanal ist nur dann leitend, wenn sich alle vier Untereinheiten im offenen Zustand befinden. Ein Kaliumkanal besteht aus vier identischen aktivierenden Untereinheiten, ein Natriumkanal setzt sich aus drei aktivierenden und einer inaktivierenden Untereinheit zusammen, deren Kinetik auf unterschiedlichen Zeitskalen erfolgt. Aus diesem Grunde unterscheidet sich zum Beispiel der zeitliche Verlauf der Anzahl offener Natrium- und Kaliumkanäle nach einem Spannungssprung über der Membran deutlich (Abb. 4.4 B und 4.5 B): Die Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle mündet nach einem Spannungssprung monoton in einen neuen Gleichgewichtszustand ein, die der Natriumkanäle fällt nach steilem Anstieg aufgrund der spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung auf einen niedrigen Wert ab. Dabei ist bei physiologischen Ionen-

konzentrationen (Tab. 2.2) und Membranspannungen die Richtung des Stromflusses durch die beiden Kanaltypen gerade entgegengesetzt.

Ion	$[C]_{extra}$ in $mMol/l$	$[C]_{intra}$ in $mMol/l$	U_{Nernst} in mV
Na^+	145	12	+67
K^+	4	155	-98
Ca^{2+}	1,5	$< 10^{-4}$	> 128
Cl^-	123	4,2	-90

Tabelle 2.2: Physiologische extra- und intrazelluläre Ionenkonzentrationen und Umkehrpotentiale einiger Ionensorten im Skelettmuskel von Säugetieren nach Hille 1992.

Für den Stromfluß durch einen Natrium- bzw. Kaliumkanal gilt nach Hodgkin und Huxley 1952:

$$I_{Na} = g_{Na_{max}} \cdot (U - U_{rev}) \cdot m_{Na}^3 \cdot h_{Na}$$

$$I_K = g_{K_{max}} \cdot (U - U_{rev}) \cdot m_K^4$$

mit g_i : Maximalleitfähigkeit des jeweiligen Ionenkanaltyps, U_{rev} : jeweiliges Umkehrpotential, $m_i = m_i(U(t), t)$: Aktivierung, $h_i = h_i(U(t), t)$: Inaktivierung, U : Spannung über der Membran.

Für die zeitliche Entwicklung der Gleichgewichtsaktivität gilt.

$$\frac{dm}{dt} = \alpha(1 - m) - \beta m \quad ,$$

wobei α und β die spannungsabhängigen Reaktionsraten in einem Zwei-Zustands-Modell für jede Untereinheit ausdrücken (Abb. 2.3).

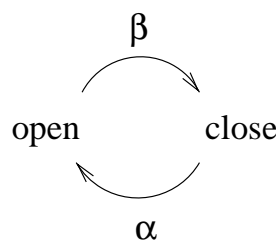


Abbildung 2.3: Zwei-Zustands-Modell für die Kinetik einer Kanaluntereinheit.

Als Lösung ergibt sich daraus für die Gleichgewichtsaktivierung:

$$m(t) = m_{\infty} - (m_{\infty} - m_0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right)$$

$$m_{\infty} = m(t = \infty), m_0 = m(t = 0), \quad \tau_m : \text{Relaxationszeit.}$$

Dabei lassen sich m_∞ und τ_m durch die Reaktionsraten $\alpha = \alpha(U)$ und $\beta = \beta(U)$ der Kanaluntereinheiten ausdrücken, m_0 ist durch die Anfangsbedingungen gegeben.

$$\begin{aligned}\tau_m &= \alpha + \beta \\ m_\infty &= \alpha / (\alpha + \beta)\end{aligned}$$

Analog läßt sich die Inaktivierung beschreiben. Die Spannung $U = U(\mathbf{r}_i)$ ist ein ortsabhängiges Potential, das von der Position aller offenen Ionenkanäle abhängt.

Tabelle 2.3 gibt die Reaktionsraten für Aktivierung und Inaktivierung für Natrium- und Kaliumkanaluntereinheiten an. Die Reaktionsraten werden durch folgende phänomenologische Gleichungen beschrieben (McCormick und Huguenard 1992, Huguenard und McCormick 1992). Das Transmembranpotential V_m wird in mV angegeben:

Natriumkanal	aktiv.	$\alpha = 0,091 \cdot (V_m + 38) / (1 - \exp[-(V_m + 38)/5])$
	inaktiv.	$\beta = -0.062 \cdot (V_m + 38) / (1 - \exp[(V_m + 38)/5])$
Kaliumkanal	aktiv.	$\alpha = 0.016 \cdot \exp[(-55 - V_m)/15]$
	inaktiv.	$\beta = 2.07 / (\exp[(17 - V_m)/21] + 1)$

Tabelle 2.3: Reaktionsraten von aktivierenden und inaktivierenden Untereinheiten von Natrium- und Kaliumkanälen.

In diesem Modell werden α und β benutzt, um das Schaltverhalten der Untereinheiten eines jeden Ionenkanals in einem Zeitschritt zu beschreiben. Natrium- und Kaliumkanäle haben jeweils eine Einzelleitfähigkeit von $20 pS$ (mittlerer Literaturwert verschiedener Präparate, Hille 1992). Das Umkehrpotential für Natriumionen liegt bei $+67 mV$, das für Kaliumionen bei $-100 mV$ (Tabelle 2.2). Die Kanäle tragen extrazellulär eine elektrophoretische Punktladung von 5 Elementarladungen.

2.4 Liganden-aktivierte Ionenkanäle

2.4.1 AMPA-Kanäle

Für die Beschreibung der Kinetik der AMPA-Kanäle wurde ein Standard-7-Zustandsmodell benutzt (Jonas *et al.* 1993), das für AMPA-Kanäle in Synapsen von CA3 Pyramidenzellen des Hippocampus von Ratten entwickelt und kalibriert wurde (Abb. 2.4). Die Reaktionsraten finden sich in Tabelle 2.4.

Die AMPA-Kanäle haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von $8,5 pS$ und ein Umkehrpotential von $0 mV$ (Jonas *et al.* 1993). Die Raten k_{10} , k_{12} und k_{16} sind

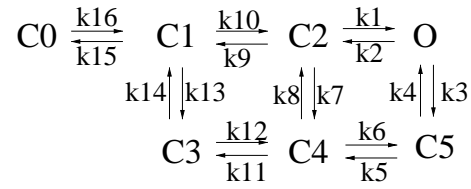


Abbildung 2.4: Standart-7-Zustandsmodell für die Kinetik des AMPA-Kanals nach Jonas *et al.* 1993.

k1	0,6
k2	4.24
k3	0,0177
k4	0,004
k5	0,19
k6	0,0168
k7	0,172
k8	0,000727
k9	3,26
k10	$28,4 \cdot [Glu]$
k11	0,0457
k12	$1,27 \cdot [Glu]$
k13	2,89
k14	0,0392
k15	4,26
k16	$4,59 \cdot [Glu]$

Tabelle 2.4: Raten des Standart-7-Zustandsmodells für die Kinetik des AMPA-Kanals nach Jonas *et al.* 1993. $[Glu]$ gibt die lokale Glutamatkonzentration in mM an.

abhängig von der lokalen Glutamatkonzentration, die hier in mM angegeben wird. Die Glutamatkonzentration wird mittels einer Diffusionsgleichung bestimmt (s.u.). Der elektrische Widerstand des Elektrolyts im synaptischen Spalt wurde mit $400 \Omega cm$ angesetzt (Nygren und Halter 1999).

2.4.2 NMDA-Kanäle

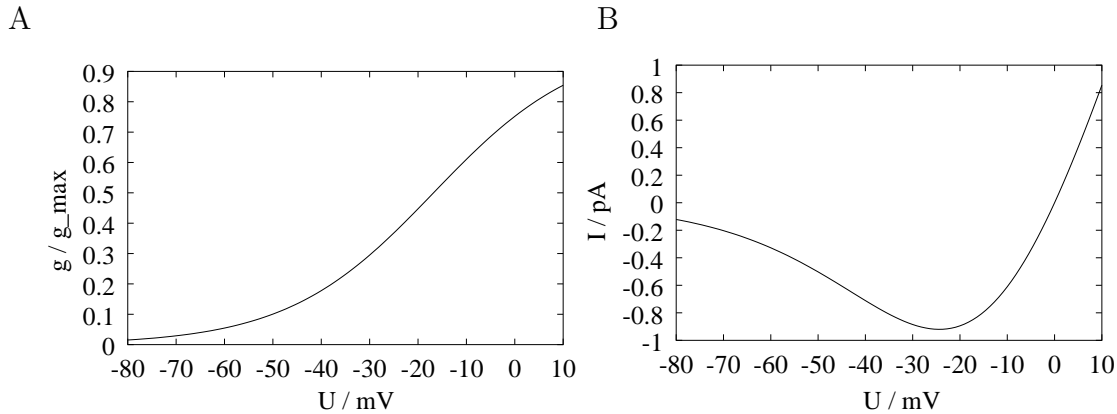


Abbildung 2.5: A: spannungsabhängige relative NMDA-Leitfähigkeit aufgrund eines $[Mg^{2+}]$ -Blockes, B: Kennlinie der NMDA-Leitfähigkeit.

NMDA-Kanäle sind Liganden-aktivierte Kanäle, die in Abhängigkeit von der Spannung durch Magnesiumionen teilweise blockiert sind. Nach Ausschüttung des Neurotransmitters öffnen die Kanäle schnell ($\tau_{akt} = 1/6 \text{ msec}$) und bleiben lange geöffnet (Zerfallszeit $\tau_{deakt} = 80 \text{ msec}$). Ihre relative Leitfähigkeit ist von der Magnesiumionenkonzentration $[Mg^{2+}]$ abhängig und wird lokal von der Spannung über der Membran U moduliert. (Jahr und Stevens 1990):

$$g/g_{max} = (1 + \eta \cdot [Mg^{2+}] \cdot e^{-\gamma U})^{-1}$$

mit $\gamma = 0,066 \text{ mV}^{-1}$ und $\eta = 0,33 \text{ mM}^{-1}$ (Jahr und Stevens 1990). Die Magnesiumionenkonzentration beträgt 1 mM . Die NMDA-Kanäle haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von 10 pS und ein Umkehrpotential von 0 mV . Abbildung 2.5 A zeigt die modellierte relative NMDA-Leitfähigkeit als Funktion der Spannung, Abbildung 2.5 B die Strom-Spannungscharakteristik.

2.4.3 Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt

Die Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran werden in Abhängigkeit von der lokalen Neurotransmitterkonzentration $c(x, y, z, t)$ erregt. Für die Transmitterkonzentration wird angenommen, daß sie aufgrund der Schmalheit des synaptischen Spaltes

einer zweidimensionalen Diffusionsgleichung genügt:

$$\frac{\partial c(x, y, t)}{\partial t} - D_T \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) c(x, y, t) = 0 \quad (2.1)$$

Die Ausschüttung des Neurotransmitters aus einem Vesikel in den synaptischen Spalt wird modelliert, indem die Anfangsverteilung des Neurotransmitters als Dirac'scher Deltapuls angenommen wird:

$$c(x, y, t = 0) = N_t \delta \left(x - \frac{L}{2} \right) \delta \left(y - \frac{L}{2} \right),$$

wobei N_T die Anzahl der Neurotransmittermoleküle in einem Vesikel angibt (3000 Moleküle) und L die Länge und Breite des Membranfleckens. Am Rand des Spaltes werden absorbierende Randbedingungen angenommen, um der Absorption des Transmitters Rechnung zu tragen. Für die Diffusionskonstante wird ein Wert von $30 \text{ nm}^2/\mu\text{sec}$ benutzt. Eine Diffusionskonstante zwischen 20 und $50 \text{ nm}^2/\mu\text{sec}$ könnte aus der beobachteten mittleren Aufenthaltszeit von Glutamat im synaptischen Spalt (Clements *et al.* 1992) abgeleitet werden (Trommershäuser *et al.* 1999). Mit diesen Werten strebt die zweidimensionale Lösung innerhalb weniger μsec gegen die vollständige dreidimensionale Lösung, sodaß die Vernachlässigung der z-Abhängigkeit gerechtfertigt ist.

2.5 Zweidimensionale Kabelgleichung

2.5.1 Herleitung

Um das Potential im schmalen Spalt zu beschreiben, wird ein Elektrodifusionsmodell für Ionen benötigt. Dazu wird ein kleines Volumenelement im Spalt betrachtet (Abb. 2.6).

Gemäß dem Kirchhoff'schen Gesetz verschwindet in einem Volumenelement die Summe aller Ströme: $\Sigma I_i = 0$ (Ladungserhaltung).

Dabei sind die Ströme parallel zur Membran für kleine Δx und Δy gegeben durch

$$\begin{aligned} I_x(x + \Delta x, y, z) &= \frac{\Delta y \cdot d}{\rho \cdot \Delta x} (U(x, y, z) - U(x + \Delta x, y, z)) + O(\Delta x^2) \\ I_x(x - \Delta x, y, z) &= \frac{\Delta y \cdot d}{\rho \cdot \Delta x} (U(x, y, z) - U(x - \Delta x, y, z)) + O(\Delta x^2) \end{aligned}$$

mit d : Abstand der Zellmembran zur Oberfläche, ρ : spezifischer Widerstand des Elektrolyts, $U(x, y, z)$: Spannung im Spalt (I_y analog).

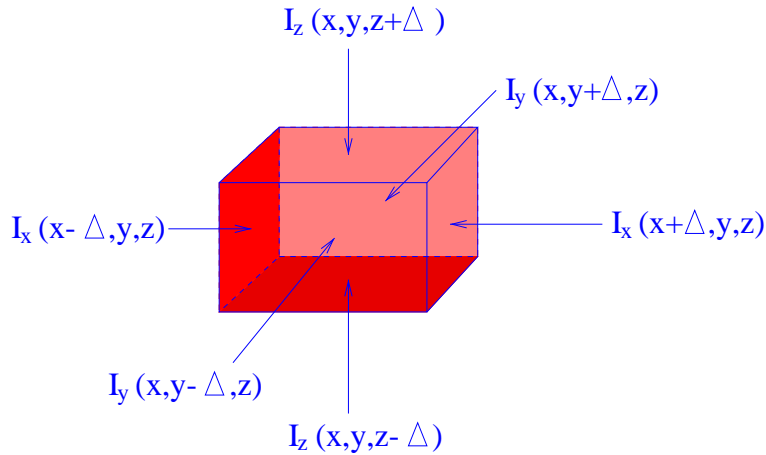


Abbildung 2.6: Stromfluß durch ein kleines Volumenelement im Spalt, dessen obere Seite von einer Zellmembran gebildet wird.

Unter der Annahme, daß aufgrund der geringen vertikalen Ausdehnung des Spaltes der Strom in z-Richtung vernachlässigt werden kann (Nygren und Halter 1999), gilt für ein Volumenelement im Spalt, das kein Membransegment beinhaltet:

$$\begin{aligned} I_z(x, y, z + \Delta z) &= 0 \\ I_z(x, y, z - \Delta z) &= 0 \end{aligned}$$

und für ein Volumenelement, dessen obere Seite von einem Membransegment gebildet wird:

$$\begin{aligned} I_z(x, y, z + \Delta z) &= C_m \frac{\partial U}{\partial t} - \sum_i I_i \\ I_z(x, y, z - \Delta z) &= 0 \end{aligned}$$

mit $C_m = C \cdot \Delta x \cdot \Delta y$: Kapazität eines Membranflächenelements, C : spezifische Membrankapazität, I_i : Strom durch einen Einzelkanal innerhalb des Membranflächenelements. Die Entwicklung der Potentiale und Anwendung des Kirchhoff'schen Gesetzes führt auf

$$\nabla^2 U = 0 \quad \text{Membransegment} \notin \text{Volumenelement} \quad (2.2)$$

$$\nabla^2 U = \frac{\rho}{d} C_m \frac{\partial U}{\partial t} - \frac{\rho}{d} \sum_i I_i \quad \text{Membransegment} \in \text{Volumenelement}. \quad (2.3)$$

Mit einem spezifischen Elektrolytwiderstand von $\rho = 100 \, \Omega \text{cm}$, einer Spaltbreite von $d = 10 \, \text{nm}$, einer Membranfläche von $0.25 \, \mu\text{m}^2$ und einer spezifischen Membrankapazität von $1 \, \mu\text{F}/\text{cm}^2$ ergibt sich für die kapazitive Relaxationszeit:

$$\tau_C = \frac{1}{4} \, \mu\text{sec} \quad . \quad (2.4)$$

Für Zeitskalen deutlich größer als die Relaxationszeit kann der kapazitive Term in (2.3) vernachlässigt werden (siehe unten), sodaß sich (2.3) in diesem Fall vereinfacht zu

$$\nabla^2 U = -\frac{\rho}{d} \sum_i I_i \quad . \quad (2.5)$$

2.5.2 Einfluß kapazitiver Komponenten

Für die in den Simulationen verwendeten Längenskalen und Zeiten hat der Term $\frac{\partial U}{\partial t}$ keinen Einfluß (siehe auch Savtchenko *et al.* 2000). Die Aktivierungszeiten der spannungsabhängigen Natriumkanäle liegen bei üblichen Membranspannungen im Bereich von 0,5 und 2 msec (Abb. 2.7). Die Zeit, die ein Ionenkanal für den Schaltvorgang benötigt, liegt unter 10 μsec (Sakmann 1992). Nach Abschnitt 2.5.1 ergibt sich eine kapazitive Relaxationszeit von $\tau_C = \frac{1}{4} \mu\text{sec}$.

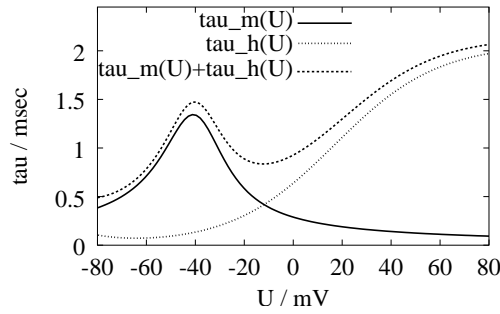


Abbildung 2.7: Schaltzeiten eines Natriumkanals als Funktion der Spannung über der Membran.

Die laterale Bewegung der Ionenkanäle in der Membran erfolgt auf einer Zeitskala von $\tau_D = \lambda^2/D$. Für eine Länge von 0,5 μm und einen Diffusionskoeffizienten von 0,1 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ergibt sich eine typische Zeit $\tau_D = 2,5 \text{ sec}$.

Die kapazitive Relaxationszeit ist deutlich schneller als die Aktivierungszeit der spannungsabhängigen Kanäle und die Kanalbewegungszeit. Die Schaltzeit der Kanäle liegt allerdings in derselben Größenordnung. Um zu testen, ob das Auswirkungen auf die Simulationsergebnisse hat, wurden Simulationen mit und ohne Berücksichtigung des kapazitiven Terms durchgeführt. Dabei wurden innerhalb des Zeitschrittes von $\Delta t = 25 \mu\text{sec}$ für die zeitliche Diskretisierung der lateralen Kanalbewegung die Kanalzustände alle 0,1 μsec aktualisiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen festgestellt werden. Eine solche Überprüfung wurde ebenfalls für ligandenaktivierte Kanäle durchgeführt.

In den im folgenden dargestellten Simulationsergebnissen wurden größtenteils Zeitschritte von $\Delta t = 25 \mu\text{sec}$ verwandt. Bei größeren Zeitschritten (bis $\Delta t = 500$

μsec in mobilen Systemen) wurde zusätzlich eine Kontrollsimulation mit $\Delta t = 25 \mu\text{sec}$ durchgeführt, um zu testen, ob der große Zeitschritt zu groß wäre und so die Ergebnisse signifikant verfälsche. Dies war niemals der Fall.

Die Trennung der Zeitskalen von Kanalaktivierungszeit und Ionenkanalbewegung erlaubt eine quasistatische Lösung der zweidimensionalen Kabelgleichung (Kapitel 3) innerhalb eines Zeitschrittes, da die Ionenkanalbewegung vergleichsweise langsam ist.

2.6 Dynamik von Ionenkanälen in einer fluiden Membran

Im mobilen System wird neben der Gleichung für die Spannungsverteilung im Spalt je eine Bewegungsgleichung für jeden der N Ionenkanäle benötigt.

Die Kanalproteine unterliegen zwei Kräften: der Diffusion und der elektrischen Drift aufgrund der Kopplung der elektrophoretischen Ladung des Ionenkanals an das elektrische Feld im Spalt zwischen Zellmembran und Oberfläche.

Die Bewegungsgleichung für ein Kanalprotein lautet:

$$m_i \cdot \ddot{\mathbf{r}}_i(t) = -\gamma \cdot \dot{\mathbf{r}}_i(t) - \nabla V(\mathbf{r}_i(t), t) + g_i(t) \quad (2.6)$$

mit m_i : Masse des Kanals, γ : Friktionskoeffizient, $g_i(t)$: stochastische Kraft, V : Potential. Im überdämpften Fall ergibt sich daraus die Langevingleichung für ein Kanalprotein:

$$\gamma \cdot \dot{\mathbf{r}}_i(t) = -\nabla V(\mathbf{r}_i(t), t) + g_i(t) \quad (2.7)$$

Aus der Forderung, daß die Verteilung im thermischen Gleichgewicht gegen die Boltzmannverteilung laufen muß, ergeben sich folgende Bedingungen für die stochastischen Kräfte (Kloeden *et al.* 1994):

$$\langle g_i(t) \rangle = 0 \quad \text{und} \quad \langle g_i(t) g_i(t') \rangle = 2\gamma kT \cdot \delta(t - t'),$$

(k : Boltzmannfaktor, T : Temperatur) alle weiteren Momente müssen verschwinden. Folglich sind die $g_i(t)$ Gauss-verteilte Zufallszahlen.

Für das über das Potential im Spalt gekoppelte Gleichungssystem aus N Langevin Gleichungen und der 2-dim Kabelgleichung wird im folgenden Kapitel ein Lösungsalgorithmus vorgestellt.

3 Lösen des Gleichungssystems

3.1 Der Algorithmus

Die N Langevingleichungen werden zeitlich diskretisiert mit Hilfe der stochastischen Eulermethode gelöst (Abschnitt 3.2). Innerhalb eines Zeitschrittes wird die zweidimensionale Kabelgleichung quasistationär gelöst (Abschnitt 3.4), und die Kanalzustände werden aktualisiert. Bei Liganden-aktivierten Kanälen muß zusätzlich die zweidimensionale Diffusionsgleichung für den Neurotransmitter im Spalt gelöst werden. Ein Umlauf in Abbildung 3.1 entspricht einem Zeitschritt Δt .

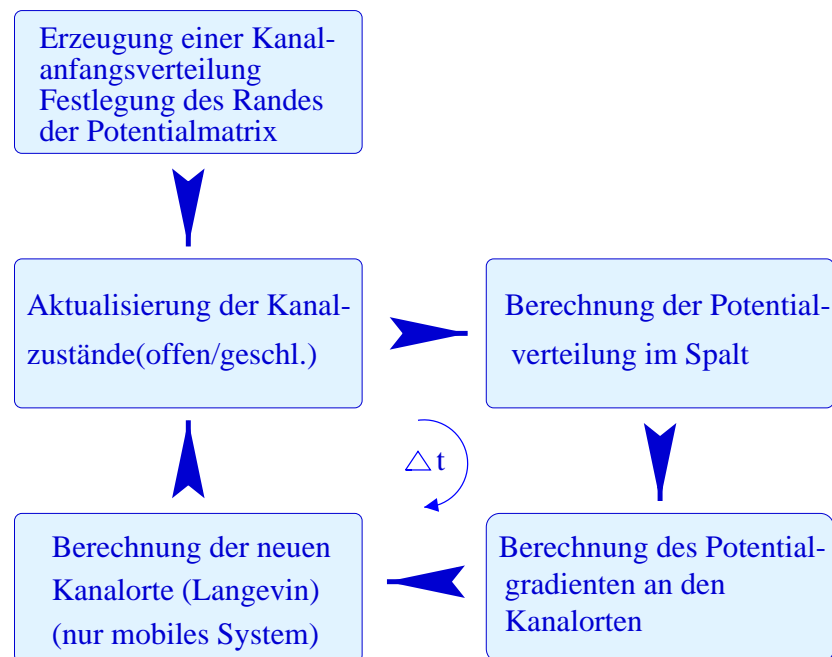


Abbildung 3.1: Schematischer Ablauf des Lösungsalgorithmus für die gekoppelten Langevingleichungen und die 2-dim. Kabelgleichung. Ein Umlauf entspricht einem Zeitschritt Δt .

3.2 Lösen der Langevingleichung mit der stochastischen Eulermethode

Die N Langevingleichungen sind über das Potential im Spalt gekoppelt. Wegen der Unstetigkeit des stochastischen Anteils läßt sich das Integral über einen kleinen Zeitraum nicht mit dem Mittelwertsatz lösen.

Die Langevingleichung (2.7) läßt sich mit $\gamma = kT/D$ (k : Boltzmannfaktor, T : Temperatur, D : ortsunabhängiger Diffusionskoeffizient) schreiben als

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \underbrace{\frac{D}{kT} \nabla V(\mathbf{r}_1 \dots \mathbf{r}_N, t) \cdot \Delta t}_{\text{Drift}} + \underbrace{\sqrt{D} \cdot f_i(t)}_{\text{Diffusion}}, \quad (3.1)$$

wobei $f_i(t)$ eine Gauß-verteilte Zufallsgröße ist, die

$$\langle f_i(t) \rangle = 0 \quad \text{und} \quad \langle f_i(t) f_i(t') \rangle = 2\Delta t \delta(t - t')$$

erfüllt (Kloeden *et al.* 1994). Das Potential V setzt sich zusammen aus dem elektrischen Potential $e_i^* \cdot U$ (e_i^* : elektrophoretische Ladung des Ionenkanals) und einem Abstoßungspotential, das ein gegenseitiges Durchdringen der Ionenkanäle verhindert. Letzteres geht so in die Simulation ein, daß eine laterale Bewegung, die zu einer Kanalüberlappung führen würde, nicht ausgeführt wird. Die $f_i(t)$ sind unabhängige Gauß-verteilte Zuwächse von der Größenordnung \sqrt{t} . Gleichung (3.1) wird in jedem Zeitschritt gelöst, wobei die $f_i(t)$ mit dem Box-Muller-Verfahren bestimmt werden (Press *et al.* 1996). Die Randbedingungen sind in den Systemen A bis G (vgl. Tab. 2.1) in beide Raumrichtungen reflektierend, im System H, das eine Röhre darstellt, in einer Raumrichtung reflektierend und in der anderen periodisch. Die Anfangswerte der Kanalorte werden zu Beginn der Simulation festgelegt. Der Zeitschritt beträgt bei den Simulationen immobiler Systeme $25 \mu\text{sec}$, bei mobilen Systemen bis zu $500 \mu\text{sec}$.

3.3 Lösen der Diffusionsgleichung für den Neurotransmitter

Die Bewegung der Transmittermoleküle im Spalt genügt einer zweidimensionalen Diffusionsgleichung (2.1). Diese wird zeitlich und räumlich diskretisiert:

$$\frac{c_{i,j}^{t+1} - c_{i,j}^t}{\Delta t} = D_T \frac{c_{i+1,j}^t + c_{i-1,j}^t + c_{i,j+1}^t + c_{i,j-1}^t - 4c_{i,j}^t}{\Delta^2}. \quad (3.2)$$

Mit Hilfe dieser Gleichung lassen sich die lokalen Konzentrationen innerhalb eines Zeitschrittes aus denen des vorangegangenen Zeitschrittes bestimmen. Die $c_{i,j}^t$ geben

die Transmitterkonzentration am Gitterplatz (i, j) zum Zeitpunkt t an, Δ den räumlichen und Δt den zeitlichen Diskretisierungsschritt (Forward-Time-Centered-Space (FTCS)-Algorithmus, siehe Press *et al.* 1996). Für die Stabilität des Algorithmus muß die Bedingung

$$\frac{4D_T\Delta t}{\Delta^2} \leq 1 \quad (3.3)$$

erfüllt sein (Press *et al.* 1996). Die physikalische Interpretation dieser Bedingung ist, daß - bis auf einen numerischen Faktor - der größte erlaubte Zeitschritt durch die Diffusionszeit des Transmitters durch ein Gittersegment begrenzt ist. Mit den in den Simulationen verwandten Werten war diese Bedingung immer erfüllt. Für den Diffusionskoeffizienten wurde ein Wert von $30 \text{ nm}^2/\mu\text{sec}$ benutzt. Es wird die zeitliche Entwicklung von 3000 Molekülen betrachtet, deren Anfangsverteilung durch einen Dirac'schen Deltapuls in der Mitte des Spaltes dargestellt wird. Die Aufnahme des Neurotransmitters am Rand des Spaltes wird durch absorbierende Randbedingungen beschrieben.

3.4 Lösen der zweidimensionalen Kabelgleichung mit der Überrelaxationsmethode

Innerhalb eines Zeitschrittes läßt sich aufgrund der Zeitskalentrennung (Abschnitt 2.5.2) die zweidimensionale Kabelgleichung quasistationär lösen. Gleichung (2.5) ist von der Form

$$\mathcal{L} U = \rho \quad (3.4)$$

mit \mathcal{L} : Laplaceoperator. Schreibt man diese Gleichung als Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial U}{\partial t} = \mathcal{L} U - \rho \quad , \quad (3.5)$$

so relaxiert eine Anfangsverteilung der Spannung für große Zeiten in ein zeitunabhängiges Gleichgewicht. Diese Gleichgewichtslösung ist Lösung von (3.4). Gleichung (3.4) läßt sich mit dem im vorherigen Abschnitt dargestellten FTCS-Algorithmus lösen, indem man den Quellterm ρ berücksichtigt und den nach der Stabilitätsbedingung (3.3) größtmöglichen Zeitschritt ($\Delta t = 1/4 \Delta^2$) einsetzt (Jacobi Methode, siehe Press *et al.* 1996):

$$U_{i,j}^{t+1} = \frac{1}{4} (U_{i+1,j}^t + U_{i-1,j}^t + U_{i,j+1}^t + U_{i,j-1}^t) - \frac{\Delta^2}{4} \rho_{i,j} \quad (3.6)$$

Da die Spannungsverteilung im Spalt in jedem Zeitschritt des Euler-Algorithmus ausgerechnet werden muß, konvergiert die Jacobi-Methode zu langsam. Die Gauss-

Seidel-Methode nutzt bereits neu berechnete lokale Spannungen, indem Schachbrett-artig iteriert wird:

$$U_{i,j}^{t+1} = \frac{1}{4} (U_{i+1,j}^t + U_{i-1,j}^{t+1} + U_{i,j+1}^t + U_{i,j-1}^{t+1}) - \frac{\Delta^2}{4} \rho_{i,j} .$$

Zur Verbesserung des Algorithmus wird der Wert der Spannung "überkorrigiert", indem der neu errechnete lokale Spannungswert gegenüber dem des vorhergehenden Iterationsschrittes über-gewichtet wird:

$$U_{i,j}^{t+1 \text{ neu}} = w U_{i,j}^{t+1} + (1 - w) U_{i,j}^t \quad , \quad 1 < w < 2 .$$

Die Konvergenzrate wird durch die am langsamsten abfallende Eigenmode bestimmt. Deren Modulus nennt man spektralen Radius. Für die Relaxation einer Poissongleichung auf einem äquidistanten $m \times m$ Gitter mit Dirichlet Randbedingung ist dieser gegeben durch (Press *et al.* 1996)

$$\rho_{Jacobi} = \cos \left(\frac{\pi}{m} \right) .$$

Um die zweidimensionale Kabelgleichung zu lösen, wurde hier die Überrelaxationsmethode benutzt und Schachbrett-artig (Gauss-Seidel) iteriert. Der Überrelaxationsparameter w wurde dabei nach jedem halben Zeitschritt angepaßt (Chebyshev-Beschleunigung, siehe Press *et al.* 1996):

$$\begin{aligned} w^0 &= 1 \\ w^{1/2} &= \left(1 - \frac{\rho_{Jacobi}^2}{2} \right)^{-1} \\ w^{n+1/2} &= \left(1 - \frac{\rho_{Jacobi}^2 w^n}{4} \right)^{-1} , \quad n = \frac{1}{2}, 1, \dots \end{aligned}$$

Die Randbedingungen sind in den Systemen A bis G Dirichlet-Bedingungen, indem der Rand der Potentialmatrix auf 0 mV festgelegt wird. Im Röhrensystem H sind abweichend davon zwei gegenüberliegende Ränder durch periodische Randbedingungen verknüpft.

Es wird auf einem 40×40 Gitter iteriert. Die Iteration bricht ab, wenn sich die lokalen Spannungswerte zweier aufeinander folgender Iterationsschritte in keinem Gitterfeld um mehr als $1/1000 \text{ mV}$ unterscheiden.

4 Computersimulationen von Ionenkanälen in einer Membran

4.1 Immobile, spannungsabhängige Systeme

Es wird ein quadratischer Membranfleck der Seitenlänge $0.5 \mu m$ modelliert, der 500 spannungsabhängige Natriumkanäle und 333 Kaliumkanäle, wie sie in Abschnitt 2.3 beschrieben wurden, enthält (System A, siehe Tab. 2.1). Die Membran befindet sich in einem Abstand von $d = 10 nm$ zu einer Oberfläche. Der elektrische Widerstand des Elektrolyts im Spalt beträgt $100 \Omega cm$. Die Membran wird intrazellulär auf $-100 mV$ "geklemmt", d. h. auf der Innenseite der Membran ist die elektrische Spannung ortsunabhängig und der zur Aufrechterhaltung dieser Spannung notwendige Stromfluß wird gemessen. Dieser ist unter Vernachlässigung des Leckwiderstandes und kapazitiver Komponenten (siehe Kapitel 2) gleich der Summe der Transmembranströme. Am Rand des Spaltes zwischen Membran und Oberfläche wird die Spannung konstant auf $0 mV$ gehalten, wie es üblicherweise in *Patch-clamp* Experimenten mittels einer Bad-elektrode festgelegt wird. Die Spannung auf der restlichen Membranaußenfläche ist damit noch nicht eindeutig bestimmt, sondern hängt von lokalen Membranströmen ab. Unter diesen Spannungsverhältnissen ist die Offenwahrscheinlichkeit für einen Natrium- oder Kaliumkanal sehr gering: Es fließt kein Strom über die Membran, und damit ist die Spannung im Spalt ortsunabhängig $0 mV$. Für $20 ms$ wird nun die Spannung auf der Membraninnenseite sprunghaft auf $-30 mV$ geändert. Diese Größe des Spannungspulses wurde gewählt, um eine maximale Stromantwort zu erhalten. Eine geringere Stromamplitude ergibt sich bei kleineren Spannungssprüngen wegen der geringeren Aktivierung der Natriumkanäle, bei größeren Spannungssprüngen aufgrund der größeren Inaktivierung der Natriumkanäle. Vor dem Spannungssprung sind die Ionenkanäle im wesentlichen geschlossen, danach ändert sich die Offenwahrscheinlichkeit für die Ionenkanäle und es fließt ein Transmembranstrom, welcher ein Spannungsgefälle im Spalt zwischen Membran und Oberfläche hervorruft. Dieses wiederum verursacht eine zeitlich veränderliche, ortsabhängige Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Ionenkanäle. Im immobil System findet keine laterale Ionenkanalbewegung statt. Es wird also in der Simulation in jedem Zeitschritt im wesentlichen die zweidimensionale Kabelgleichung gelöst und der Schaltzustand der

Kanäle aktualisiert.

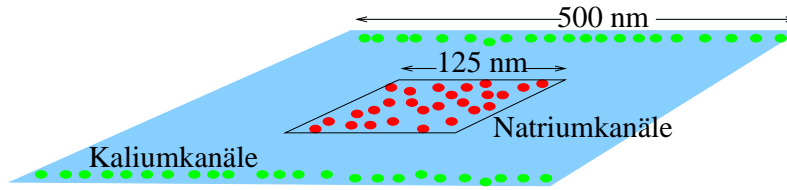


Abbildung 4.1: Beispiel für eine Ionenkanalverteilung: "zentrierte" Natriumkanalverteilung und "Rand" Kaliumkanalverteilung.

Es werden unterschiedliche Verteilungen der Ionenkanäle betrachtet: In der "zentrierten" Verteilung befinden sich die Ionenkanäle gleichverteilt auf der Fläche eines Quadrats von $0.125 \mu m$ Seitenlänge in der Mitte der Membran, in der "homogenen" Verteilung gleichverteilt auf der gesamten Membran und bei der "Rand" Verteilung sitzen die Ionenkanäle gleichverteilt auf zwei sich gegenüberliegenden Rändern der Membran (Abb. 4.1). Schließlich wird eine zweikomponentige Verteilung innerhalb einer Kanalsorte betrachtet (Abb. 4.6), die später beschrieben wird.

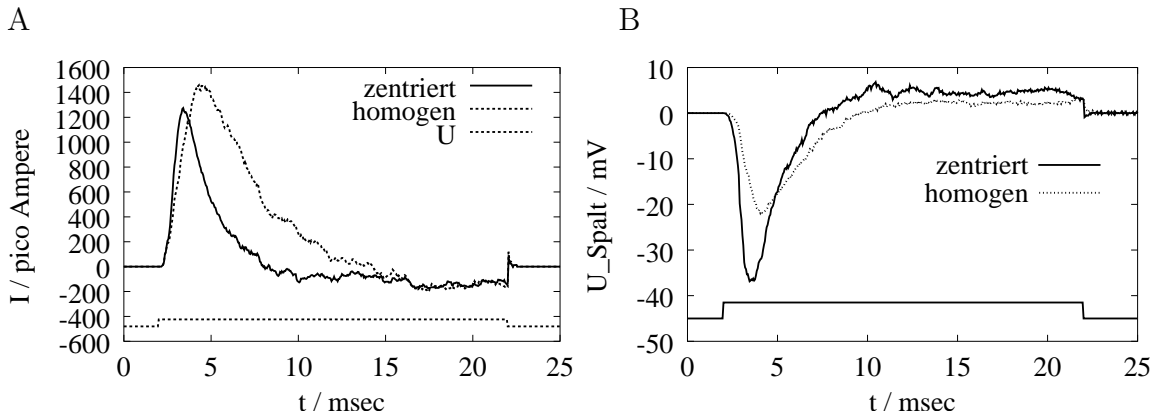


Abbildung 4.2: A: Abhängigkeit der Stromantwort von der Ionenkanalverteilung, B: zeitlicher Verlauf des korrespondierenden Potentials im Zentrum des Spaltes (zentriert und homogen bezieht sich jeweils auf beide Kanalsorten).

Abbildung 4.2 A zeigt einen Vergleich der Stromspuren einer Computersimulation eines Systems mit zentrierter Natrium- und Kaliumkanalverteilung mit einem System mit homogenen Verteilungen. Die Stromantwort des zentrierten Systems ist schärfer und ein wenig kleiner in der Maximalamplitude als die des homogenen Systems. Abbildung 4.2 B zeigt die zugehörige zeitliche Entwicklung der Spannung im Spalt unter der Mitte der Membran (in der Mitte der Membran ist der Effekt maximal, für ein

räumliches Spannungsprofil siehe Abb. 4.3. C und D). Die zeitliche Änderung des Potentials im Spalt ist im zentrierten System ungefähr doppelt so groß wie im homogenen (Abb. 4.2 B). Damit sind Offenwahrscheinlichkeit und elektrochemischer Gradient für die Ionenkanäle unterschiedlich und damit auch die Stromantwort des gesamten Systems (Abb. 4.2 A).

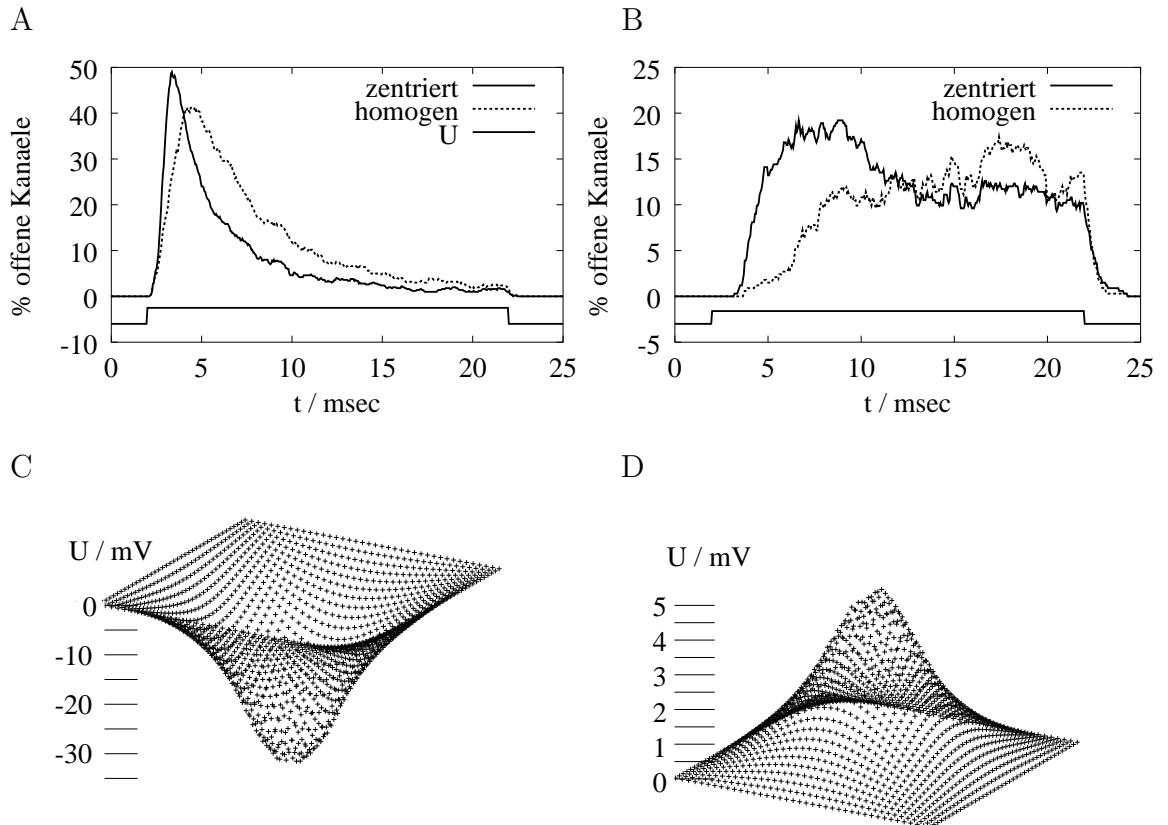


Abbildung 4.3: A: Abhängigkeit von offenen Natriumkanälen von der Kanalverteilung, B: Abhängigkeit von offenen Kaliumkanälen von der Kanalverteilung, C+D: Spannungsprofil im Spalt während eines Spannungspulses im zentrierten System, C: nahe des Maximums der offenen Natriumkanäle, D: gegen Ende des Spannungspulses bei hoher Kaliumkanal Offenwahrscheinlichkeit.

Abbildung 4.3 A und B zeigen die zu Abbildung 4.2 zugehörigen Anteile offener Natrium- und Kaliumkanäle. Natrium- und Kaliumkanäle aktivieren im zentrierten System schneller als im homogenen, da der Stromfluß durch einen bereits offenen Natriumkanal nahe der Membranmitte das Potential im Spalt stärker lokal absenkt und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit für benachbarte Kanäle in größerem Maße erhöht (Abb. 4.2 A, 4.3 C) als es bei Stromfluß durch einen Natriumkanal am Rand

der Membran der Fall ist. Der Anteil offener Kaliumkanäle im zentrierten System wird 10 *msec* nach Pulsbeginn kleiner als der im homogenen System, weil das positivere Potential in der Mitte des Spaltes (Abb. 4.2 B) die Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle herabsetzt. Abbildung 4.3 C und D zeigen die räumliche Verteilung des Spannungsprofils bei hohem Natriumeinstrom (3,48 *msec* nach Pulsbeginn) und hohem Kaliumausstrom (18 *msec* nach Pulsbeginn) im zentrierten System. Die raum-zeitliche Variation des Potentials im Spalt während eines Spannungspulses liegt zwischen -38 *mV* und +5 *mV*; das ist ein beträchtlicher Anteil des Spannungsgradienten über der Membran. Dies zeigt sich auch im Einfluß auf die Stromantwort des Systems (Abb. 4.3. A und B).

Für einen reinen Hodgkin/Huxley Kaliumkanal würde man als Antwort auf einen solchen Spannungspuls eine monoton steigende, saturierende Kurve für die Offenwahrscheinlichkeit erwarten, wie sie in Abbildung 4.5 B zu sehen ist, da der Kaliumkanal keine inaktivierende Untereinheit besitzt. Trotzdem weist die Offenwahrscheinlichkeit des zentrierten Systems in Abbildung 4.3 B eine scheinbare Inaktivierung auf. Die enge Nachbarschaft von Natrium- und Kaliumkanälen im zentrierten System erzeugt ein Überschießen der Kaliumkanal Offenwahrscheinlichkeit, indem der Natriumeinstrom das Potential im Spalt und damit ebenso den Betrag des Spannungsgradienten über der Membran erniedrigt, was einen Anstieg der Kaliumkanal Offenwahrscheinlichkeit zur Folge hat. Dieser Effekt ist in der Mitte der Membran am größten (Abb. 4.3 C), sodaß eine zentrale Kaliumkanalverteilung stärker davon beeinflusst wird als eine homogene oder eine Rand Verteilung. Zu späteren Zeiten verringert das positivere Potential im Spalt die Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle. Auf diese Weise werden die zunächst unabhängigen Hodgkin/Huxley Ionenkanäle über das Potential im Spalt gekoppelt. Da die Aktivierung des Kaliumkanals spannungsabhängig ist, die Inaktivierung aber nicht, läßt sich aus dem Verlauf der offenen Kaliumkanäle (Abb. 4.3 B) indirekt auf die Änderung des Potentials im Spalt schließen.

Abbildung 4.4 A zeigt die Stromantwort eines Systems mit Kaliumkanalverteilung Rand und Natriumkanalverteilung zentriert bzw. Rand. Abbildung 4.4 B gibt die entsprechende zeitliche Entwicklung des Anteils offener Natriumkanäle wider. Im System Rand benötigt die Aktivierung der Natriumkanäle mehr Zeit als im zentrierten System und die maximale Anzahl aktivierter Kanäle beträgt nur 2/3 gegenüber der des homogenen Systems. Letzterer Effekt wird durch den größeren elektrochemischen Gradienten für Natriumionen kompensiert, sodaß die maximale Amplitude der Stromantwort im System Rand sogar etwas größer ausfällt (Abb. 4.4 A). Der Anteil offener Kaliumkanäle wird von der Natriumkanalverteilung ebenfalls beeinflusst: Die scheinbare Inaktivierung der Kaliumkanäle (Abb. 4.3 B) tritt im System mit Natriumkanalverteilung Rand nicht auf (Abb. 4.5 B), da die durch die Natriumkanäle hervorgerufene Änderung des Spaltpotentials am Rand des Membranfleckens

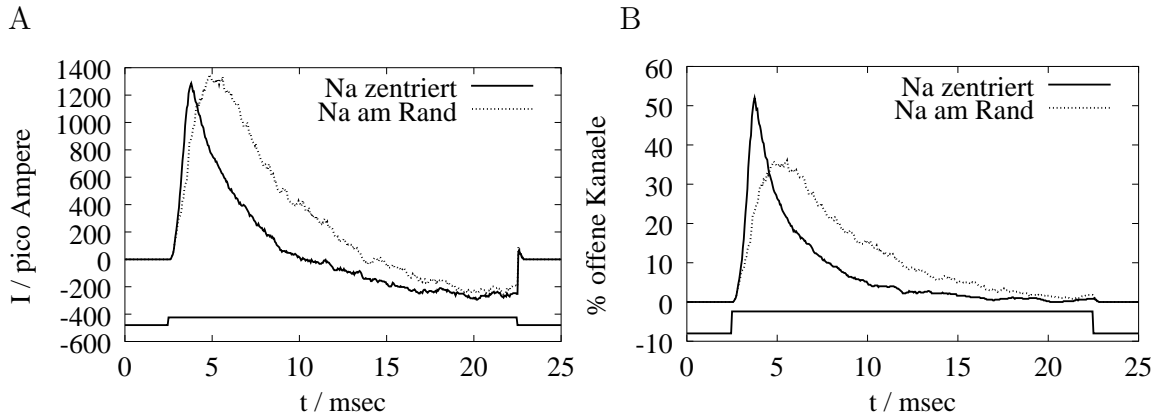


Abbildung 4.4: A: Abhängigkeit der Stromantwort von der Natriumkanalverteilung, B: zugehöriger Verlauf des Anteils offener Natriumkanäle. Die Kaliumkanalverteilung ist Rand und wird nicht verändert.

verhältnismäßig gering ist.

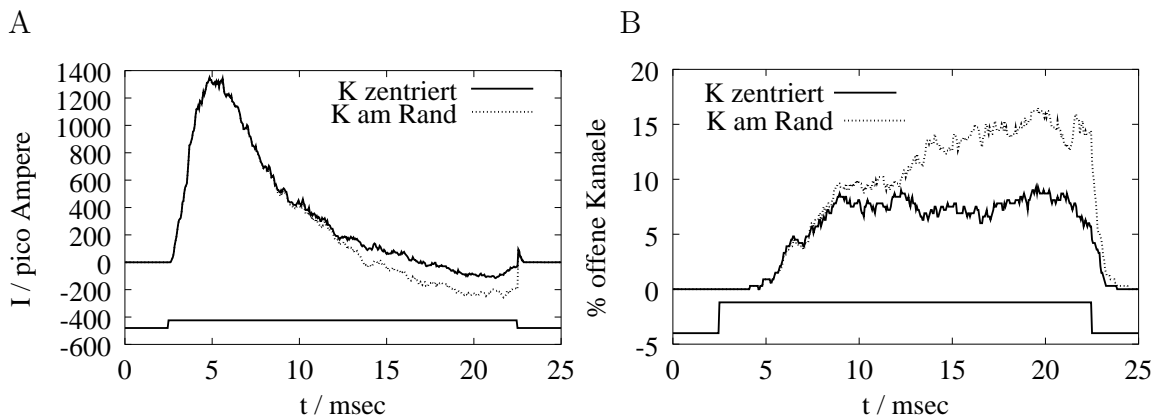


Abbildung 4.5: A: Abhängigkeit der Stromantwort von der Kaliumkanalverteilung, B: zugehörige zeitliche Entwicklung des Anteils offener Kaliumkanäle. Die Natriumkanalverteilung ist Rand und bleibt unverändert.

Abbildung 4.5 A zeigt die Stromantwort eines Systems mit Natriumkanalverteilung Rand und Kaliumkanalverteilung Rand bzw. zentriert. In Abbildung 4.5 B ist die entsprechende zeitliche Entwicklung des Anteils der offenen Kaliumkanäle dargestellt. Eine Änderung in der Kaliumkanalverteilung beeinflusst nur den Schwanz der Stromkurve, da die Kaliumkanäle vergleichsweise langsam aktivieren und somit so gut wie keinen Einfluß auf die Aktivierung der Natriumkanäle ausüben. Der maximale Anteil offener Kanäle des zentrierten Systems ist ungefähr halb so groß wie der

des Systems Rand, weil das resultierende positive Potential im Spalt die Offenwahrscheinlichkeit der Kaliumkanäle verringert und ihr Einfluß im Zentrum der Membran maximal ist (Abb. 4.3 D).

Folglich haben beide, Natrium- und Kaliumkanalverteilung, einen deutlichen Einfluß auf die Stromantwort des Systems. Die Kanalverteilungen legen vor allem die *Form* der Stromantwort auf einen Spannungspuls fest.

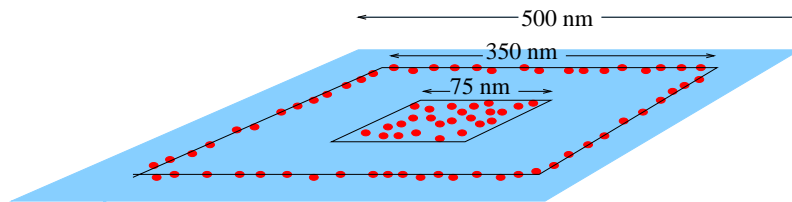


Abbildung 4.6: Zweikomponentige Verteilung: Die Natriumkanäle befinden sich teilweise auf der Fläche eines zentrierten Quadrats von 75 nm Seitenlänge in der Mitte der Membran, teilweise auf dem Rand eines zentrierten Quadrates mit Seitenlänge 350 nm.

Die Veränderung der Stromantwort durch die Natriumkanalverteilung soll im Folgenden über die Inaktivierung der Natriumkanäle, also über die typische Abfallszeit der Natriumstromkurve quantitativ beschrieben werden. Dazu werden die Natriumkanäle in variierenden Verhältnissen auf zwei Verteilungen aufgesplittet (Abb. 4.6): 1. gleichverteilt auf der Fläche eines zentrierten Quadrates der Seitenlänge 75 nm und 2. gleichverteilt auf der Kante eines zentrierten Quadrates der Seitenlänge 350 nm. Zusätzlich kann eine zentrierte Kaliumkanalverteilung überlagert werden.

Abbildung 4.7 A zeigt den Abfall einer simulierten Stromkurve mit ihrer entsprechenden einfach exponentiell gefitteten Kurve. In Abbildung 4.7 B ist die typische Abfallszeit der Stromkurve in Abhängigkeit von der Besetzung der inneren Natriumkanalverteilung mit und ohne zusätzliche zentrierte Kaliumverteilung angegeben. Für stark gekoppelte Natriumkanäle ergeben sich kleine Abfallszeiten, mit zunehmendem Anteil der Kanäle im äußeren Bereich wird die Kopplung geringer und damit die Abfallszeit länger. Eine zusätzlich überlagerte zentrierte Kaliumkanalverteilung verschiebt die Kurve zu kürzeren Abfallszeiten hin. Dies ist nicht verwunderlich, da der Strom durch die Kaliumkanäle dem der Natriumkanäle entgegengerichtet ist und so zu einem schnelleren Abfall der Stromkurve beiträgt. In Abbildung 4.7 B wurde für jede Verteilung über 5 Stromkurven gemittelt und dann die Zeitkonstante bestimmt.

Verantwortlich für die beschriebenen Effekte ist der kleine Abstand zwischen Membran und Oberfläche: Die Offenwahrscheinlichkeit der Ionenkanäle ist über das Potential im Spalt gekoppelt, das seinerseits durch den Strom durch offene Kanäle

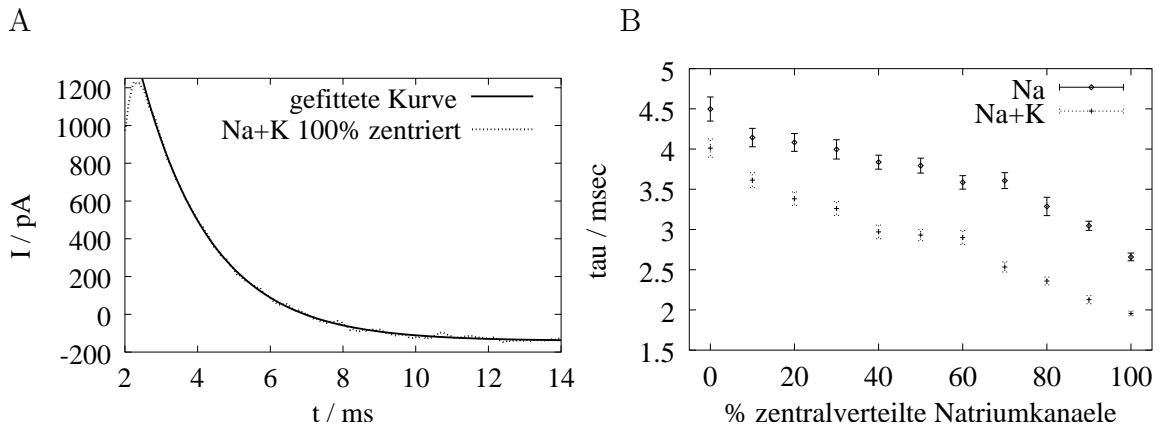


Abbildung 4.7: A: simulierte Stromkurve als Antwort auf einen Spannungspuls und einfach exponentiell gefitteter Abfall, B: typische Abfallszeit der Stromkurve in Abhängigkeit von der Verteilung der Natriumkanäle mit und ohne überlagerte zentrierte Kaliumkanalverteilung, jeweils über fünf Simulationen gemittelt.

geformt wird. Folglich erhöht das Öffnen eines Natriumkanals mittels des Stromflusses die Offenwahrscheinlichkeit benachbarter Natriumkanäle, indem das Potential im Spalt lokal abgesenkt wird. In der kurzen Zeitspanne bevor die Inaktivierung der Natriumkanäle einsetzt ist dies ein Selbstverstärkungsmechanismus.

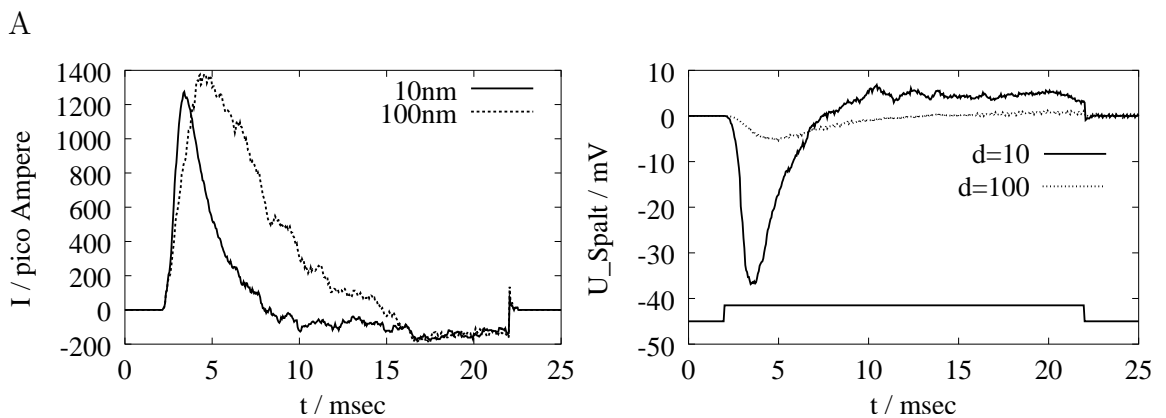


Abbildung 4.8: A: Abhängigkeit der Stromantwort vom Abstand d für zentrierte Ionenverteilungen bei einer Spaltgröße von 10 bzw 100 nm, B: entsprechende Zeitentwicklung des Spaltpotentials in der Mitte der Membran.

Ist der Spalt relativ groß (100 nm oder mehr) können durch Änderungen in der Kanalverteilung gar keine oder nur noch kleine Änderungen in der Form des Signals erzeugt werden. Abbildung 4.8 zeigt ein System mit zentrierten Ionenkanalverteilung

gen bei unterschiedlichen Abständen d zwischen Membran und Oberfläche. Ist der Abstand klein (10 nm) ist die für zentrierte Verteilungen typische scharfe Signalform zu erkennen, ist der Abstand groß (100 nm), sind die Kanäle nur noch schwach über das Potential im Spalt gekoppelt, da dieses über den gesamten Puls räumlich und zeitlich annähernd konstant ist (Abb. 4.8 B). An der Potentialgleichung (Kapitel 2) läßt sich das Verschwinden desselben nachvollziehen: Wählt man den Abstand d sehr groß, so verschwindet die Krümmung des Potentials und die Randbedingung erfordert 0 mV im gesamten Spalt.

4.2 Liganden-aktivierte Kanäle, synaptische Kontakte

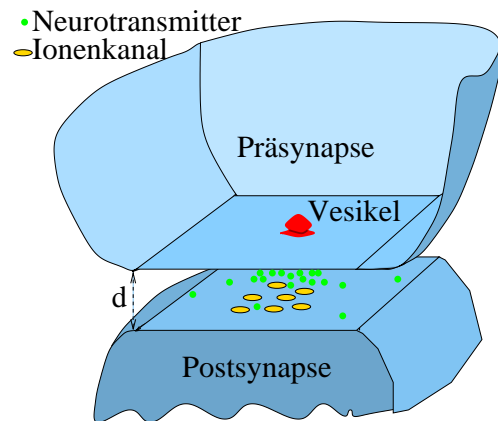


Abbildung 4.9: Aufbau der Modellsynapse mit postsynaptischer Dichte

Es wird eine Synapse im zentralen Nervensystem modelliert, indem die Präsynapse als elektrisch inaktive Oberfläche betrachtet wird und die Postsynapse als nicht fluide Membran, in der sich 100 AMPA-Kanäle in zentraler Verteilung zur Simulation einer postsynaptischen Dichten (PSD) befinden (System B, Tab. 2.1). Prä- und Postsynapse sind durch einen 10 nm breiten synaptischen Spalt getrennt, den ein Elektrolyt mit einer spezifischen Leitfähigkeit von $400\text{ }\Omega\text{cm}$ ausfüllt (Abb. 4.9). Die Postsynapse wird intrazellulär auf -60 mV gehalten. Der Beginn jeder Simulation geht mit der Ausschüttung des Neurotransmitters in der Mitte des Spaltes einher, der mit der Zeit durch den Spalt diffundiert. Erreichen Transmittermoleküle den Rand des Spaltes, werden sie absorbiert (vgl. Kapitel 2 und 3). Abbildung 4.10 zeigt einen Schnitt durch das simulierte Konzentrationsprofil des Transmitters mit der Zeit als Parameter.

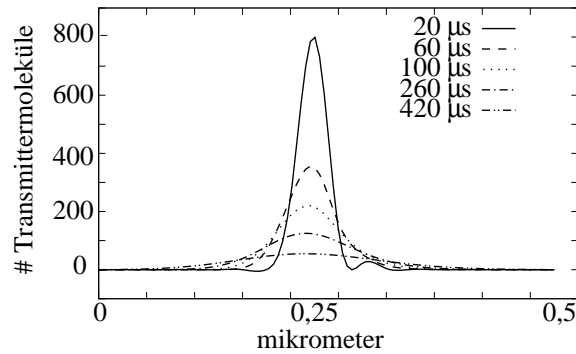


Abbildung 4.10: A: Schnitt durch das Ligandenprofil im synaptischen Spalt jeweils 20, 60, 100, 260 und 420 μsec nach Ausschüttung des Neurotransmitters in der Mitte der Membran.

Abbildung 4.11 A zeigt die Offenwahrscheinlichkeit der AMPA-Kanäle als Funktion der Zeit nach Ausschüttung des Neurotransmitters bei $t = 0 \text{ msec}$. Nach steilem Anstieg erreicht die Offenwahrscheinlichkeit nach etwas über einer halben Millisekunde ein Maximum und fällt dann innerhalb von 8 msec wieder auf 0 ab.

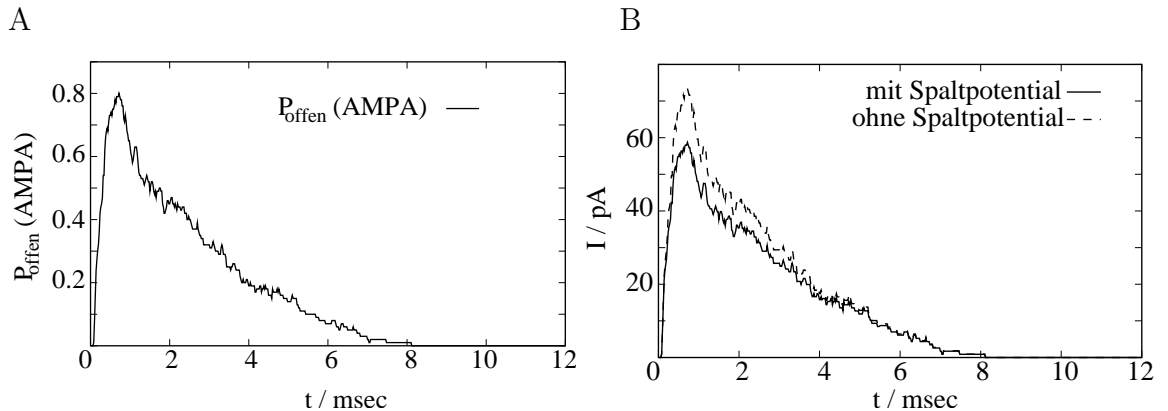


Abbildung 4.11: A: Offenwahrscheinlichkeit von AMPA-Kanälen nach Ausschüttung des Neurotransmitters bei $t = 0 \text{ msec}$, B: Gesamtstrom durch AMPA-Kanäle mit und ohne Berücksichtigung des Spaltpotentials.

In Abbildung 4.11 B ist der Gesamtstrom durch die AMPA-Kanäle mit und ohne Berücksichtigung des lokalen Potentials im Spalt als Funktion der Zeit dargestellt. Unter Berücksichtigung des lokalen Spaltpotentials fällt die Stromantwort kleiner aus, da die den Strom antreibende Spannung über der Membran reduziert ist. Dieser Effekt wird nicht, wie bei den spannungsabhängigen Natriumkanälen im vorhergehenden Abschnitt, durch eine Änderung in der Kanaloffenwahrscheinlichkeit kom-

pensiert.

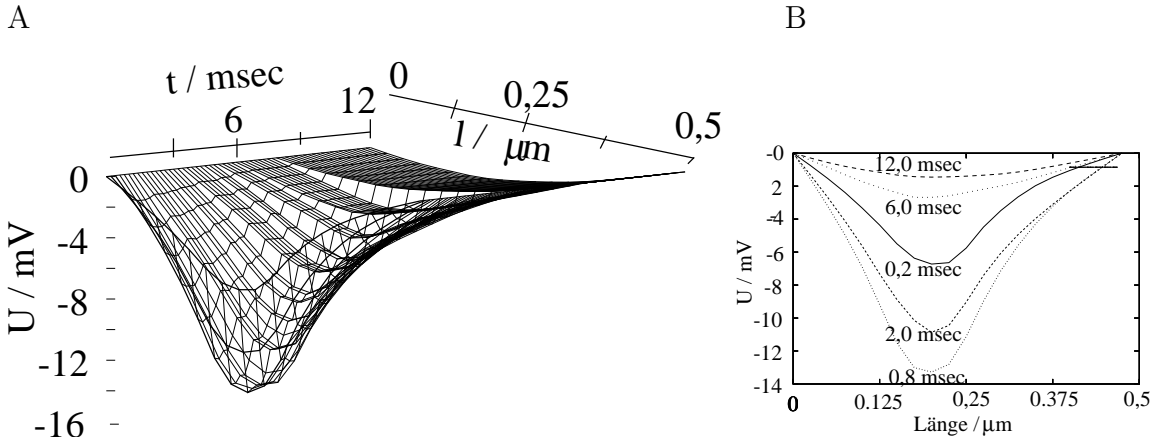


Abbildung 4.12: A: zeitliche Entwicklung des Spaltpotentials auf einer Achse durch den Membranmittelpunkt nach Ausschüttung des Neurotransmitters bei $t = 0 \text{ msec}$, B: Schnitt durch das Spannungsprofil im Spalt für ausgewählte Zeiten.

Abbildung 4.12 A zeigt einen Schnitt durch das Potential auf einer Linie in x -Richtung durch den Mittelpunkt des Spaltes über einen Zeitraum von 12 msec , wobei alle $0,2 \text{ msec}$ ein *linescan* durchgeführt wurde. Einhergehend mit der zeitlichen Entwicklung der Offenwahrscheinlichkeit der AMPA-Kanäle (Abb. 4.11 A) bildet sich nach etwas über einer halben Millisekunde ein Potentialmaximum in der Mitte des Spaltes aus. Das Potential verliert innerhalb von 8 msec wieder seine räumliche Struktur und geht auf 0 mV zurück. Abb. 4.12 B zeigt die räumliche Potentialverteilung längs einer Linie durch den Spaltemittelpunkt für einige aus Abbildung A ausgewählte Zeiten. Das Potentialmaximum in der Mitte des Spaltes wird nach ca. $0,6 \text{ msec}$ erreicht.

Zusätzlich zu den zentral verteilten AMPA-Kanälen werden 10 NMDA-Kanäle gleichverteilt auf der Fläche eines zentrierten Quadrates mit 75 nm Seitenlänge eingebracht (System C, siehe Abb. 4.13 A). Abbildung 4.13 B zeigt die zeitliche Entwicklung des Stromes durch die NMDA-Kanäle mit und ohne Berücksichtigung des Spaltpotentials nach Auslösung eines Neurotransmitterpulses bei $t = 0 \text{ msec}$. Der Stromfluß durch offene AMPA-Kanäle führt zu einer Ausbildung eines raum-zeitlich veränderlichen Spaltpotentials (Abb. 4.12). Die daraus folgende lokale Depolarisation im Zentrum der postsynaptischen Membran bewirkt eine weitgehende Aufhebung des Magnesiumblocks der dort ansässigen NMDA-Kanäle (vgl. Abb. 2.5 B). Demzufolge ist der Stromfluß durch die NMDA-Kanäle unter Berücksichtigung des Spaltpotentials deutlich größer als ohne dessen Berücksichtigung (Abb. 4.13 B). Dieser Befund wird in Zusammenhang mit LTP-Hypothesen in Kapitel 8 diskutiert.

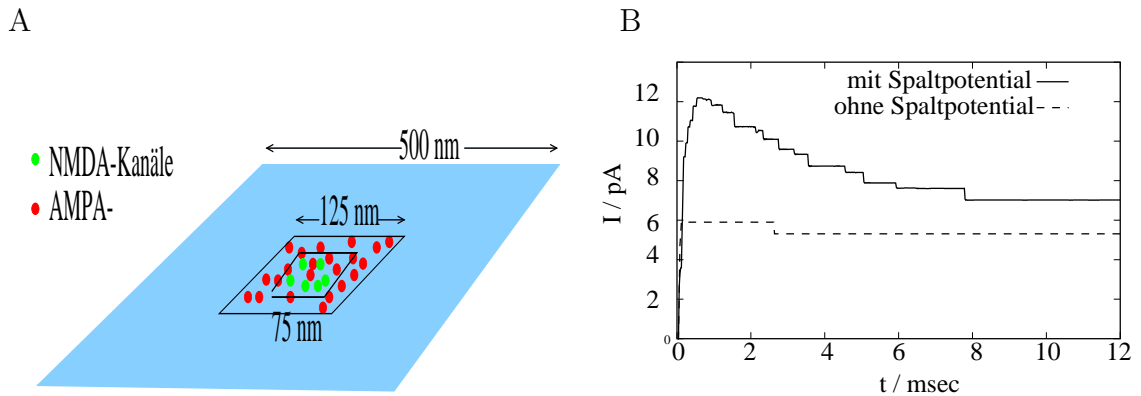


Abbildung 4.13: A: Verteilung von AMPA- und NMDA-Kanälen in der postsynaptischen Modellmembran, B: Strom durch NMDA-Kanäle in Anwesenheit von AMPA-Kanälen mit und ohne Berücksichtigung des Spaltpotentials.

4.3 Musterbildung in Systemen mit zeitlich konstantem Antrieb

In diesem Abschnitt werden Simulationsergebnisse von Systemen mit fluiden Membranen vorgestellt. Die Ionenkanäle sind nun nicht mehr wie zuvor durch ein Zytoskelett an bestimmten Plätzen fixiert, sondern können sich ausgehend von einer Anfangsverteilung lateral mit einem Diffusionskoeffizienten $D = 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der fluiden Membran bewegen. Dabei unterliegen sie der Diffusionsbewegung und aufgrund ihrer elektrophoretischen Ladung einer Drift (siehe Kapitel 2). Sie werden als Kreisscheiben mit einem Radius von 1 nm modelliert und können sich nicht durchdringen.

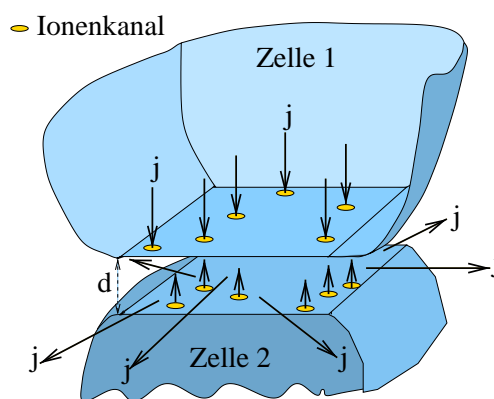


Abbildung 4.14: Die einander gegenüberliegenden Membranen zweier benachbarter Zellen bilden einen schmalen Spalt. Für die Simulation werden nur diese Zellsegmente betrachtet.

In zwei quadratischen Membranflecken von 1 μm Kantenlänge, die einen Abstand von 10 nm zueinander haben (Abb. 4.14), befinden sich jeweils 20 Ionenkanäle mit einer Einzelkanalleitfähigkeit von 20 pS und einem Umkehrpotential von 0 mV (Kationen-Kanäle oder Gramicidin-Poren, Hille 1992). Die Kanäle sind während der Simulation permanent geöffnet (System D, Tab. 2.1). Auf den Innenseiten der Membranen wird die Spannung ortsunabhängig jeweils auf -100 mV konstant gehalten, das Potential am Rande des Spaltes beträgt 0 mV . Die Ionenkanäle tragen eine elektrophoretische Punktladung von $e^* = 2,5 e$, der elektrische Widerstand des Elektrolyts beträgt 100 Ωcm .

Die Abbildungen 4.15 A, C und E zeigen das raum-zeitliche Selbstorganisationsverhalten der Ionenkanäle für einen Zeitraum von 4 sec . Die Ionenkanäle starten zu Beginn der Simulation in beiden Membranen homogen verteilt und streben innerhalb weniger Sekunden zur Mitte der Membran. Es bilden sich dort einander gegenüberliegende Bereiche hoher Ionenkanaldichte. Zur besseren Ansicht sind die Kanäle viel größer dargestellt, als ihre Ausdehnung in der Simulation ist. Hierauf sind die in den Abbildungen scheinbaren Überlappungen von Kanälen zurückzuführen. Das Potential im Spalt zwischen den Membranen ist am Anfang recht schwach ausgeprägt ($< 2 mV$). Es bilden sich an Stellen höherer Kanaldichte Spannungspeaks aus (Abb. 4.15 B und D), die sich dann, einhergehend mit der Konzentration der Kanäle in der Mitte der Membran, unter der Mitte der Membran zu einem Potentialpeak von 13 mV vereinen (Abb. 4.15 F).

Wie Abbildung 4.16 zeigt, ist die Ursache für das Selbstorganisationsverhalten der Kanäle der schmale Spalt zwischen den Membranen, in dem sich aufgrund des lokalen Ionenstromes ein elektrisches Feld ausbildet, an welches die Ionenkanäle mit ihrer elektrophoretischen Ladung koppeln und somit eine Drift auf das Zentrum der Membran hin erfahren. Ist der Spalt groß (100 nm oder mehr), gewinnt die Diffusion, die die Ionenkanäle in einen gleichverteilten Zustand treibt, gegenüber der vergleichsweise kleinen, gerichteten Drift an Bedeutung, sodaß es auch auf längeren Zeitskalen nicht mehr zu einer Konzentration der Kanäle in der Mitte kommt (Abb. 4.16 A und C). Das sonst den Selbstorganisationsprozeß antreibende Spaltpotential ist auf der hier angegebenen Spannungsskala im gesamten Spalt annähernd 0 mV (Abb. 4.16 D).

Abbildung 4.17 stellt den zeitlichen Verlauf des mittleren Abstandes

$$\bar{r} = \frac{1}{N} \sum_i |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{Zentrum}|$$

von Kanälen verschiedener Kanalsorten der oberen Membran zum Zentrum der Membran dar. Dabei werden Kationenkanäle (Umkehrpotential 0 mV , System D), Chloridkanäle (Umkehrpotential +70 mV , System E) und Kaliumkanäle (Umkehrpotential +70 mV , System F) miteinander verglichen. Das Potential auf den Innenseiten der Membran beträgt jeweils -70 mV , das Potential am Rand des Spaltes 0 mV . Die

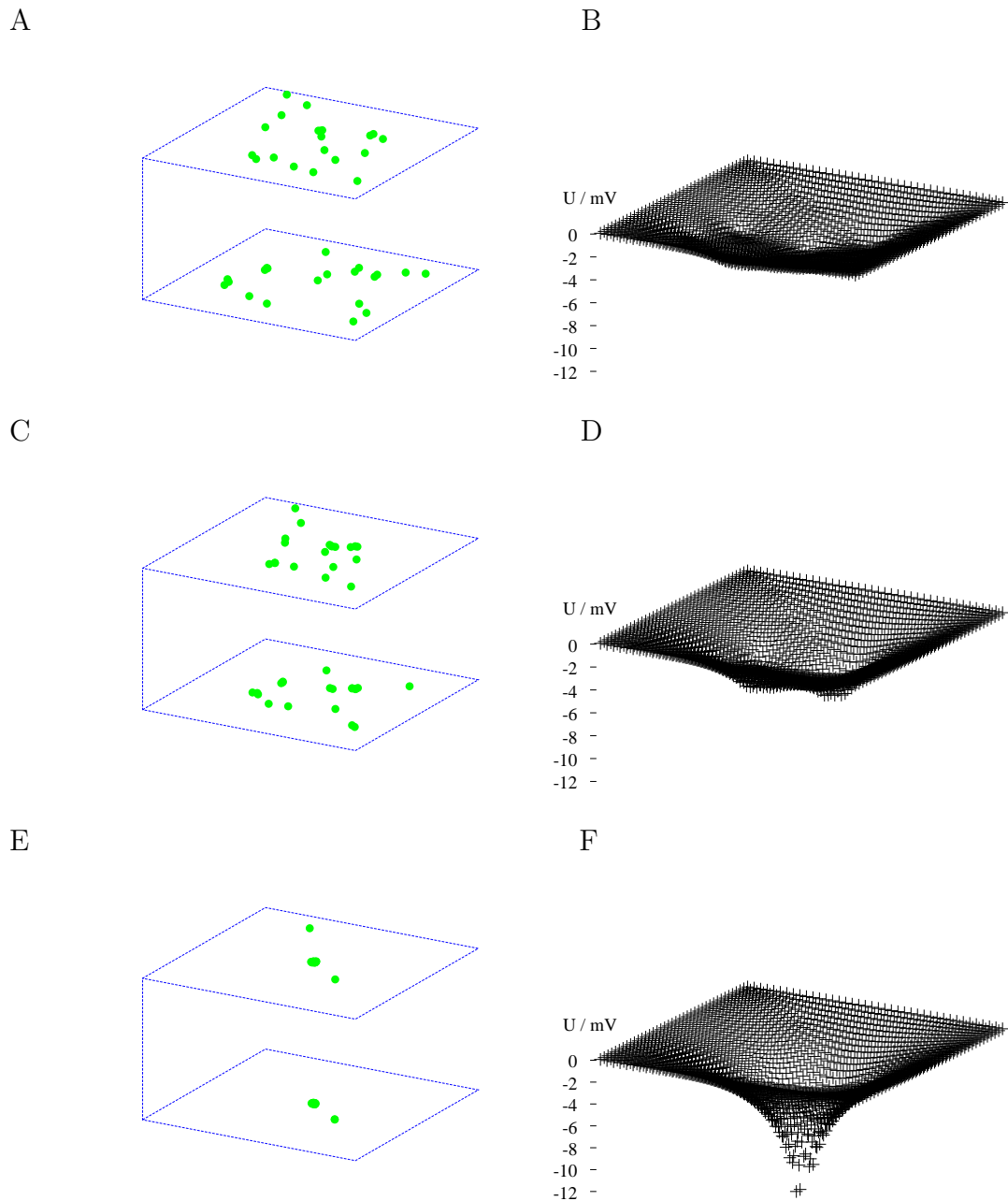
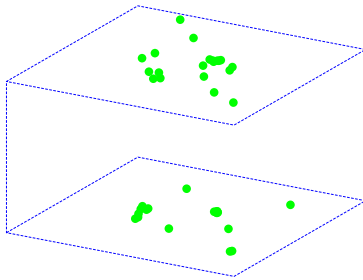
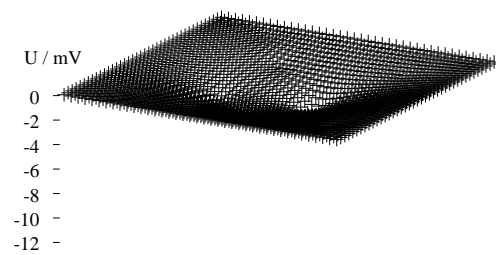


Abbildung 4.15: Raum-zeitliches Selbstorganisationsverhalten zweier Membranen im Abstand von 10 nm, ausgehend von einer homogenen Anfangskanalverteilung. Die linken Abbildungen zeigen jeweils die Kanalverteilungen, die rechten das jeweilige Potential im Spalt: A, B: nach 1 sec, C, D: nach 2 sec, E, F: nach 4 sec. Die Ionenkanäle sind übertrieben groß dargestellt, wodurch es zu scheinbaren Kanalüberlappungen kommt.

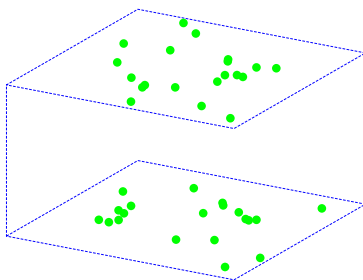
A



B



C



D

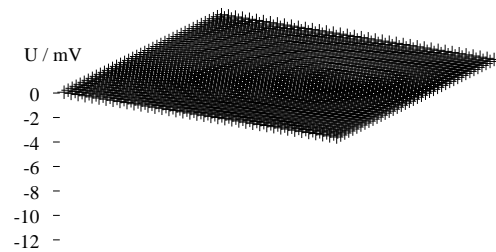


Abbildung 4.16: Das raum-zeitliche Selbstorganisationsverhalten verliert mit Vergrößerung des Abstandes zwischen den Membranen an Bedeutung, bis letztlich bei großen Abständen keine Musterbildung mehr beobachtet wird (Jeweils die linken Abbildungen zeigen die Kanalverteilungen, die rechten das jeweilige Potential im Spalt bei A, B: $d=20 \text{ nm}$ nach 4 sec, C, D bei 100 nm nach 8 sec.).

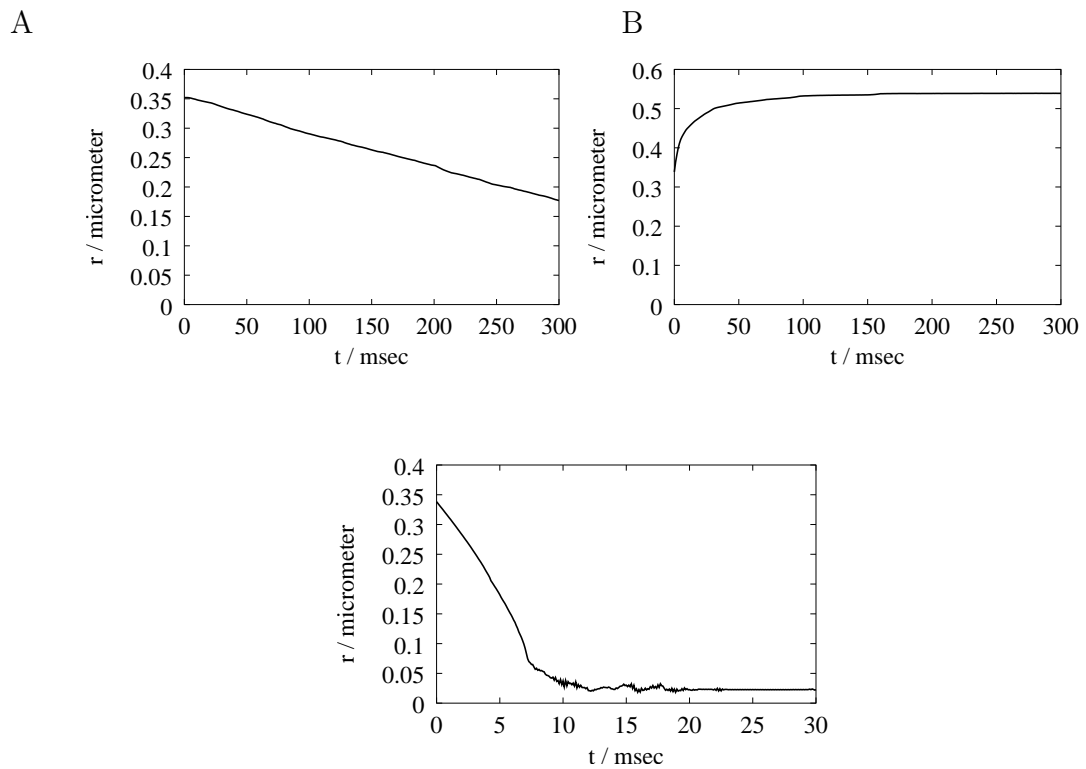


Abbildung 4.17: Mittlerer Abstand der Ionenkanäle vom Mittelpunkt für verschiedene Kanaltypen. A: Kationenkanal, B: Kaliumkanal, C: Chloridkanal (andere Zeitskala). Die Kanaltypen unterscheiden sich nur durch ihr Umkehrpotential.

Kanäle haben eine Einzelkanalleitfähigkeit von 8 pS , tragen eine elektrophoretische Punktladung von 5 Elementarladungen und sind permanent geöffnet. Es befinden sich 15 Ionenkanäle einer Sorte jeweils in einer Membran.

Die Kationenkanäle nähern sich in dem betrachteten Zeitintervall von 300 msec annähernd linear an die Mitte der Membran an (Abb. 4.17 A). Die Chloridkanäle sammeln sich wie die Kationenkanäle in der Mitte der Membran, jedoch aufgrund der größeren treibenden Kraft, die das positive Umkehrpotential verursacht, deutlich schneller und mit einer anderen, nichtlinearen Kinetik (Abb. 4.17 C). Die Chloridkanäle sind bereits nach ca. 10 ms in der Mitte der Membran versammelt. Sie bewegen sich die ersten 8 msec immer schneller auf das Zentrum zu, um sich dann vermutlich aufgrund der gegenseitigen Behinderung langsamer anzunähern. Die Kaliumkanäle bewegen sich von der Mitte der Membran weg (Abb. 4.17 B). Der mittlere Abstand der Kanäle zum Zentrum der Membran saturiert, da die Kanäle die Membran nicht verlassen können, sondern an den Rändern des Membranfleckens reflektiert werden. Aufgrund des stark negativen Umkehrpotentials der Kaliumkanäle bildet sich ein positives Potential im Spalt aus, das die positiv geladenen Kanäle auseinander treibt.

4.4 Musterbildung in Systemen mit zeitlich periodischem Antrieb im Patch

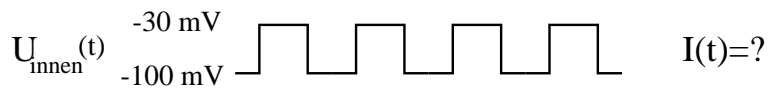


Abbildung 4.18: Das System wird durch eine Spannungspulsfolge mit einer Amplitude von 70 mV angetrieben, die Stromantwort wird gemessen.

Ein quadratischer Membranfleck der Seitenlänge $0,5\text{ }\mu\text{m}$ enthält 500 Natrium- und 333 Kaliumkanäle (wie in Kapitel 2) beschrieben und befindet sich im Abstand von 10 nm an einer Oberfläche (Abb. 2.1, System G). Die Ionenkanäle tragen eine elektrophoretische Punktladung von 5 Elementarladungen und haben einen Radius von 10 nm . Der spezifische Elektrolytwiderstand beträgt $100\text{ }\Omega\text{cm}$. Das System startet mit gleichverteilten Natrium- und Kaliumkanälen. Das System wird intrazellulär durch eine Spannungspulssequenz angetrieben. Die Spannungspulse sind so gewählt, daß im zeitlichen Mittel möglichst viele Ionenkanäle geöffnet sind, um ein möglichst ausgeprägtes Spannungsprofil im Spalt zu erhalten, das wiederum eine starke Drift der Ionenkanäle bewirkt. Dabei ist zu beachten, daß bei langem Verweilen auf einem höheren Spannungsniveau die Natriumkanäle bereits inaktiviert sind und bei kurzem Verweilen auf niedrigem Spannungsniveau in den Pulspausen viele Natriumkanäle noch nicht aus dem inaktivierten in den deaktivierten Zustand übergegangen sind, also für eine erneute Aktivierung noch nicht wieder zur Verfügung stehen.

(Refraktärzeit). In Abschnitt 4.1 wurde bereits festgestellt, daß ein intrazellulärer Spannungsprung von -100 mV auf -30 mV einen guten Kompromiß aus schneller Aktivierung der Natriumkanäle bei noch nicht zu rascher Inaktivierung darstellt. Als Pulslänge und Pulspause stellt sich ein Zeitraum von 10 msec als günstig heraus.

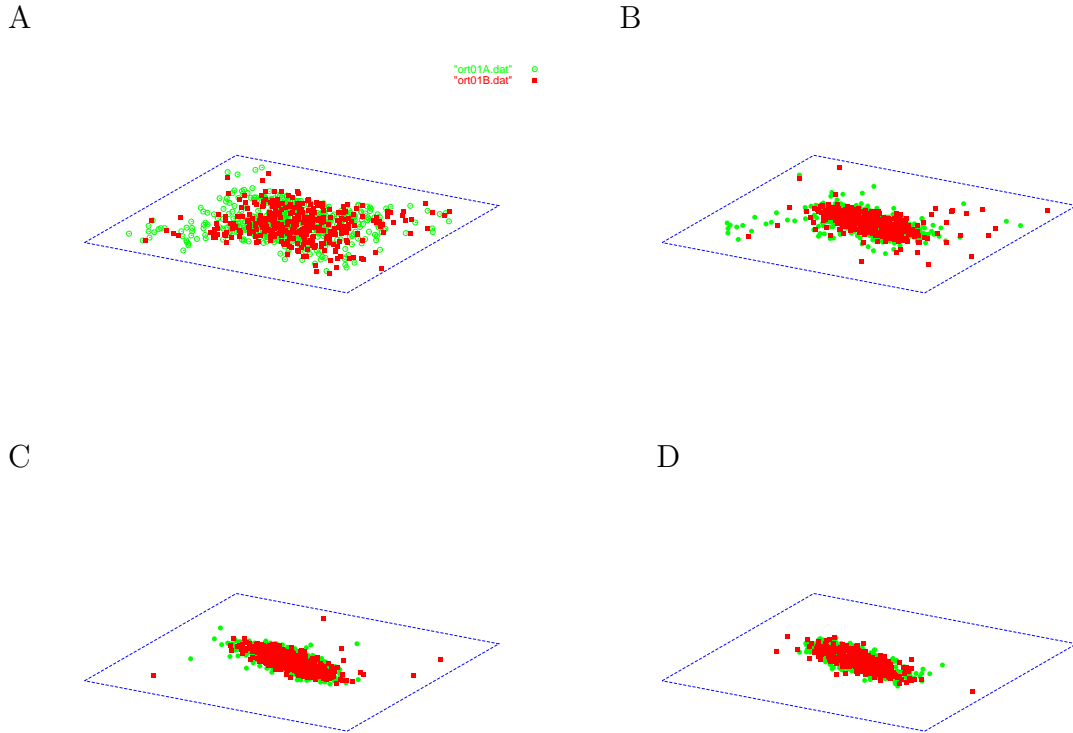


Abbildung 4.19: Als Antwort auf eine Pulsfolge zeigt das mobile System ein raumzeitliches Ordnungsverhalten. Das System startet zur Zeit $t=0\text{ sec}$ mit 333 gleichverteilten Kaliumkanälen und 500 gleichverteilten Natriumkanälen. A: $0,8\text{ sec}$, B: $1,6\text{ sec}$, C: $3,2\text{ sec}$, D: $6,4\text{ sec}$ nach Simulationsbeginn (rot: Natriumkanäle, grün: Kaliumkanäle).

Abbildung 4.19 zeigt ein System, das mit einer Sequenz aus Pulsen von 10 msec Dauer und Pausen von 10 msec angetrieben wird. Die Ionenkanäle zeigen ein raumzeitliches Ordnungsverhalten auf einer mit den Kationenkanälen (Abb. 4.15) vergleichbaren Zeitskala von wenigen Sekunden: Natrium- und Kaliumkanäle streben zur Mitte der Membran. Nach etwas mehr als 6 sec bilden die Kanäle einen elliptischen Flecken, dessen große Achse sich im Laufe der Zeit in Richtung der Membrandiagonalen ausrichtet, um den Randbedingungen auszuweichen (Abb. 4.19 C und D). Die Fläche des Fleckens beträgt ungefähr $3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$, was einer quadratischen Fläche von ca. $175 \times 175\text{ nm}$ entspricht, und scheint nicht weiter zu kollabieren. Wären die

Kanäle dicht gepackt, so würden sie ein Quadrat von der Seitenlänge 50 nm ausfüllen.

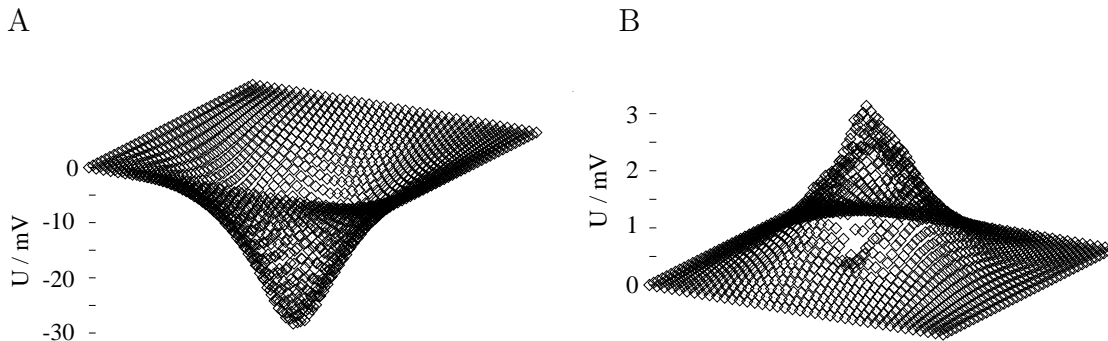


Abbildung 4.20: Potential im Spalt bei hoher Natrium- (A) bzw. Kaliumkanalaktivität (B) bei einer Kanalverteilung, wie sie Abbildung 4.19 D zeigt.

Die Kanäle nähern sich aus folgenden Gründen einander nicht weiter an: Zum einen treibt die Diffusionsbewegung die Kanäle in den Pulspausen auseinander, zum anderen ist das Potential im Spalt am Ende des Spannungspulses positiv, da der Transmembranstrom aufgrund der nicht vorhandenen Inaktivierung der Kaliumkanäle dann fast ausschließlich von Kaliumionen getragen wird. Abbildung 4.20 zeigt das Spannungsprofil im Spalt während maximaler Natrium- bzw. Kaliumkanalaktivität bei einer Kanalverteilung, wie sie Abbildung 4.19 D darstellt. Das für die Kanäle in der Anfangsphase des Pulses zur Mitte hin attraktive Spaltpotential treibt die Kanäle gegen Ende des Pulses von der Mitte weg (Abb. 4.20). Je stärker die Kanäle konzentriert sind, desto stärker ist die rücktreibende Kraft (Abb. 4.22 B). Weiterhin behindern sich die Kanäle aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung gerade in der attraktiven Phase, da sie aus verschiedenen Richtungen auf dasselbe Ziel zustreben.

Aufgrund der unterschiedlich gerichteten Kanalbewegung innerhalb des zeitlichen Verlaufes eines Pulses sowie der Diffusionsbewegung in der Pulspause bilden die Kanäle kein statisches Endmuster. Dennoch ist der Fleck großer Kanaldichte nicht strukturlos. Um dies darzustellen ist in Abbildung 4.21 der Abstand eines Kanals vom Mittelpunkt des Fleckes gegen die Anzahl von Nachbarkanälen derselben Kanalsorte, die nicht weiter als 10 nm von ihm entfernt sind, aufgetragen. Kalium- und Natriumkanalverteilung weisen ein unterschiedliches Muster auf: Kaliumkanäle mit vielen Nachbarn befinden sich nur sehr dicht am Zentrum des Fleckens, Natriumkanäle mit 7 Nachbarn hingegen kommen auch bei einem Abstand von 5 Gittereinheiten vor (eine Gittereinheit entspricht $1/40 \mu m$), wobei beide Kanalsorten die gleiche elektrophoretische Ladung tragen, sich mit dem gleichen Diffusionskoeffizienten bewegen und sich auch in den Anfangsbedingungen nicht unterscheiden.

Die Ergebnisse des Abschnitts 4.1 deuten bereits daraufhin, daß mit den Änderungen in den Kanaldichten eine Änderung in der Stromantwort des Systems auf

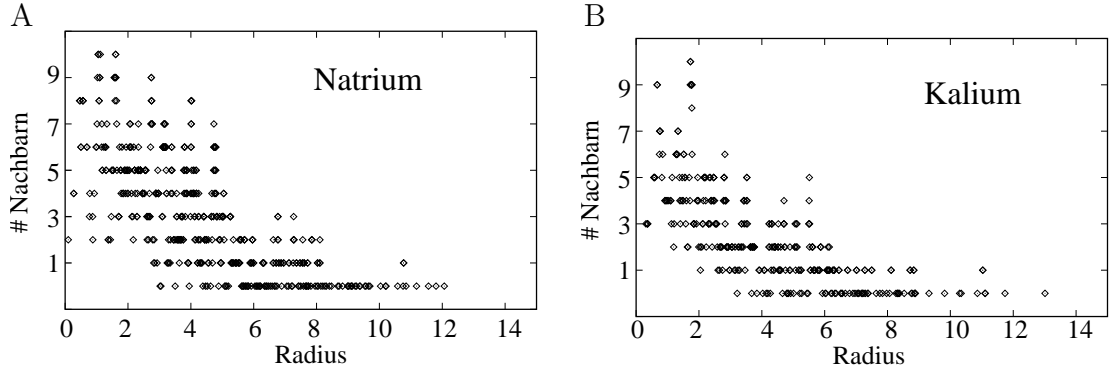


Abbildung 4.21: Anzahl benachbarter Kanäle derselben Sorte in Abhängigkeit vom Abstand des Kanals zum Mittelpunkt des Gebietes erhöhter Kanaldichte. A: Natriumkanäle, B: Kaliumkanäle.

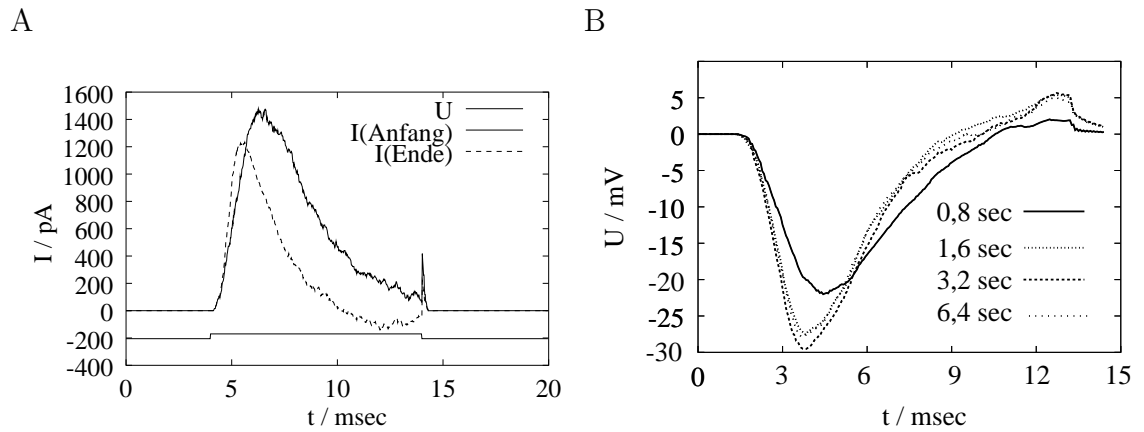


Abbildung 4.22: Die Stromantwort des Systems (A) und das Potential im Spalt (B) auf einen Spannungspuls ändern sich im fluiden System mit der Zeit.

einen Spannungspuls einhergeht. So ist die Stromantwort am Anfang der Simulation relativ breit (ca. 4 msec Halbwertsbreite) und wird im Laufe der Zeit immer schmaler, bis sie gegen Ende der Simulation die für zentrale Kanalverteilungen typische prägnante Form (ca. 2 msec Halbwertsbreite) erreicht (Abb. 4.22 A). Dabei geht die Maximalamplitude leicht zurück, wiederum ein Effekt, der aus Abschnitt 4.1 bereits bekannt ist. Folglich sollte es möglich sein, in einem *Patch-Clamp* Experiment unter diesen Bedingungen an einer Membran, die spannungsabhängige Kanäle enthält, durch fortwährende Reizung durch Spannungspulse die Fluidität der Membran durch die Änderung der Stromantwort nachzuweisen. Der Effekt ist reversibel, d. h. in längeren Pulspausen in der Größenordnung der typischen Diffusionszeit ($D^{-1} \cdot (\text{Membranfläche})^2 = 10 \text{ sec}$) strebt das System in den gleichverteilten Zustand zurück. Damit verbreitert sich die Stromantwort auf einen nachfolgenden Spannungspuls.

4.5 Musterbildung im Röhrensegment

4.5.1 System mit periodischem Antrieb

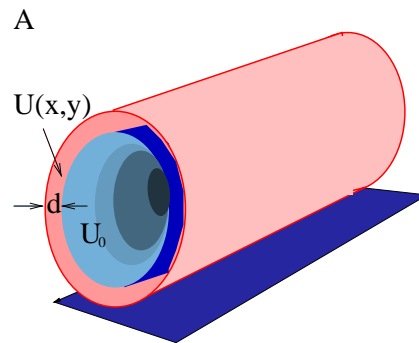


Abbildung 4.23: Ein Röhrensegment wird unter Vernachlässigung von Krümmungseffekten als Fläche mit periodischen Randbedingungen modelliert. Es beschreibt ein Zylinderförmiges Zellsegment dicht an einer konzentrischen, zylindrischen Oberfläche.

Bei den folgenden Simulationen wird ein System mit reflektierenden Randbedingungen in eine Raumrichtung und periodischen Randbedingungen in die andere Raumrichtung für die Ionenkanalbewegung betrachtet, um ein Röhrensegment unter Vernachlässigung von Krümmungseigenschaften zu simulieren (System H, Abb. 4.23). Für das Potential bedingen entsprechende Dirichlet Randbedingung in eine Raumrichtung und periodische Randbedingung in die andere Raumrichtung die elektrische Spannung im Spalt. Das Röhrensegment läßt sich als zylindrisches Zellsegment, beispielsweise als ein Axonstück, interpretieren, das in eine Umgebung aus im Abstand d konzentrisch angeordneter Membran - z.B. eine Myelinschicht - eingebettet ist. Die

Spannung an der Innenseite des Röhrensegments wird als ortsunabhängig konstant angenommen, die Spannung im Spalt weist ein Spannungsprofil auf. Das System startet zur Zeit $t=0 \text{ sec}$ mit 333 gleichverteilten Kaliumkanälen und 500 gleichverteilten Natriumkanälen mit den in Kapitel 2 angegebenen Eigenschaften. Das Röhrensegment hat eine Länge von $0,5 \mu\text{m}$ und einen Umfang von $0,5 \mu\text{m}$.

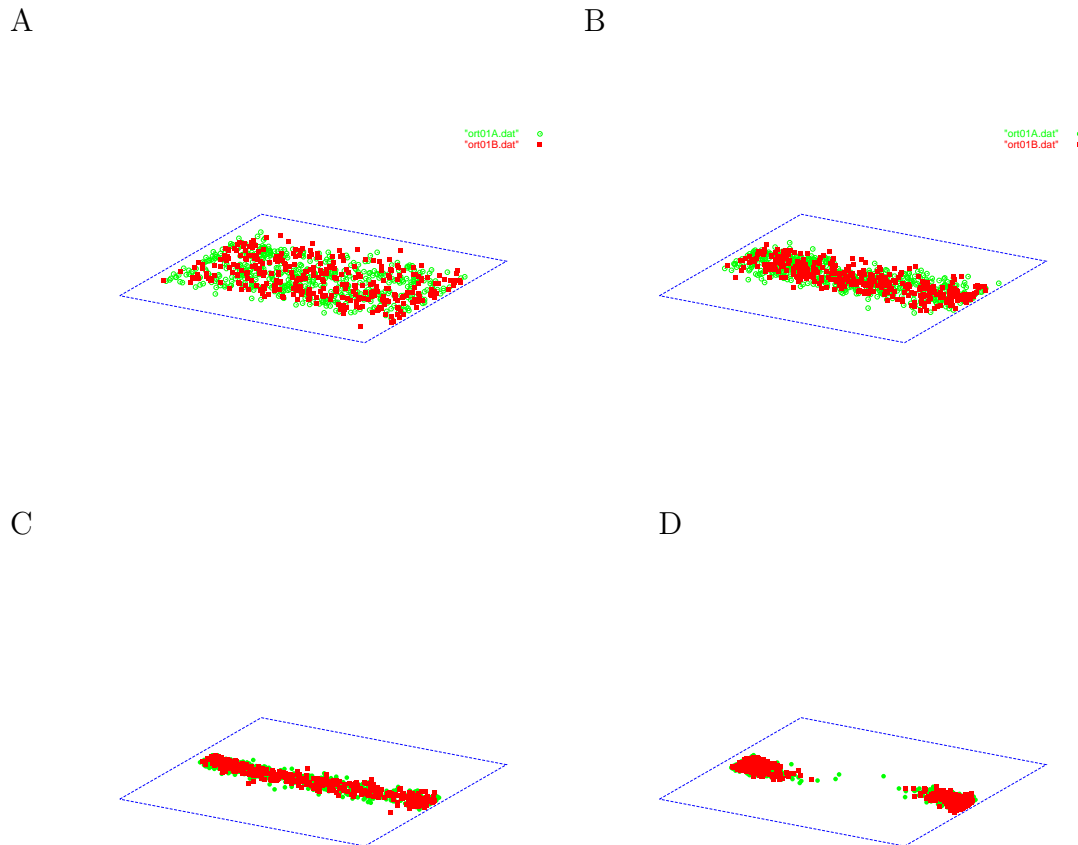
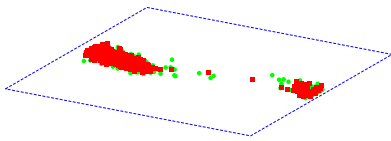


Abbildung 4.24: Als Antwort auf eine Pulsfolge zeigt das mobile System ein raumzeitliches Ordnungsverhalten. Das System startet zur Zeit $t=0 \text{ sec}$ mit 333 gleichverteilten Kaliumkanälen und 500 gleichverteilten Natriumkanälen. A: $0,4 \text{ sec}$, B: $0,8 \text{ sec}$, C: $1,6 \text{ sec}$, D: $12,8 \text{ sec}$. (rot: Natriumkanäle, grün: Kaliumkanäle).

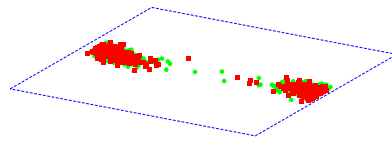
Abbildung 4.24 zeigt die zeitliche Entwicklung eines solchen Systems, das mit einer im vorigen Abschnitt beschriebenen Pulsfolge getrieben wird. Gemäß der Symmetrie des Systems bilden die Kanäle zunächst innerhalb von 1 bis 2 Sekunden ein schmales Band um die Mitte der Röhre (Abb. 4.24 B und C). Dieses bricht jedoch innerhalb von 12 sec zusammen und die Kanäle bilden ein ellipsenförmiges Feld auf

einer Seite in der Mitte der Röhre (Abb. 4.24 D). Die periodischen Randbedingungen gelten an der rechten und linken Kante, sodaß die beiden Dichtemaxima über die Kante verbunden sind. Der Zusammenbruch des Bandes ist vermutlich auf räumliche Kanaldichtefluktuationen innerhalb des Bandes zurückzuführen, die einen Symmetriebruch herbeiführen und somit ein globales Potentialminimum im Spalt bewirken, auf das die Kanäle zustreben.

A



B



C

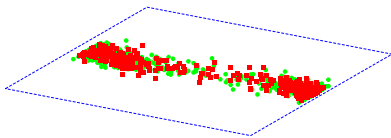


Abbildung 4.25: Verglichen werden gepulste Systeme mit Spannungspulsen von -100 mV auf -30 mV und 10 msec Länge nach 8 Sekunden mit A: Pulspause= 5 ms , B: Pulspause= 10 ms , C: Pulspause= 20 ms , (rot: Natriumkanäle, grün: Kaliumkanäle).

Abbildung 4.25 zeigt den Einfluß eines gepulsten Systems auf die Pausenlänge zwischen 10 msec langen Pulsen von -100 mV auf -30 mV im Vergleich nach jeweils 8 sec Simulationszeit bei gleichen Anfangsbedingungen. Je länger die Pausen zwischen den Pulsen, desto ineffektiver reagiert das System. Wird die Pulspause zu klein ($< 5\text{ msec}$) fällt der zweite Puls in die Refraktärzeit des ersten, d. h. die Natriumkanäle sind noch nicht vom inaktivierten in den deaktivierten Zustand übergegangen und können somit bei erneuter Depolarisation der Membran nicht aktivieren. Das verringert wiederum den Spannungsgradienten im Spalt.

4.5.2 Einfluß einer Leckleitfähigkeit

In einer Biomembran gibt es neben den spannungsabhängigen Kanälen eine Vielzahl von Proteinen in Form von Ionenkanälen oder Ionenpumpen, die Ionen ein Durchqueren der Membran ermöglichen. Ein Großteil dieser Leitfähigkeiten läßt sich im Labor auf chemischem Wege blockieren (Hille 1992), im allgemeinen ist aber ein Reststrom nicht auszuschließen. Der Einfluß dieses Reststromes auf den Selbstorganisationsprozeß wird im folgenden betrachtet. Dazu werden alle möglichen Restleitfähigkeiten als immobile, kontinuierliche und räumlich homogen verteilte Leckleitfähigkeit (Umkehrpotential bei 0 mV) in das Modell eingebracht. Die Leckleitfähigkeit wird innerhalb von 6 Größenordnungen variiert.

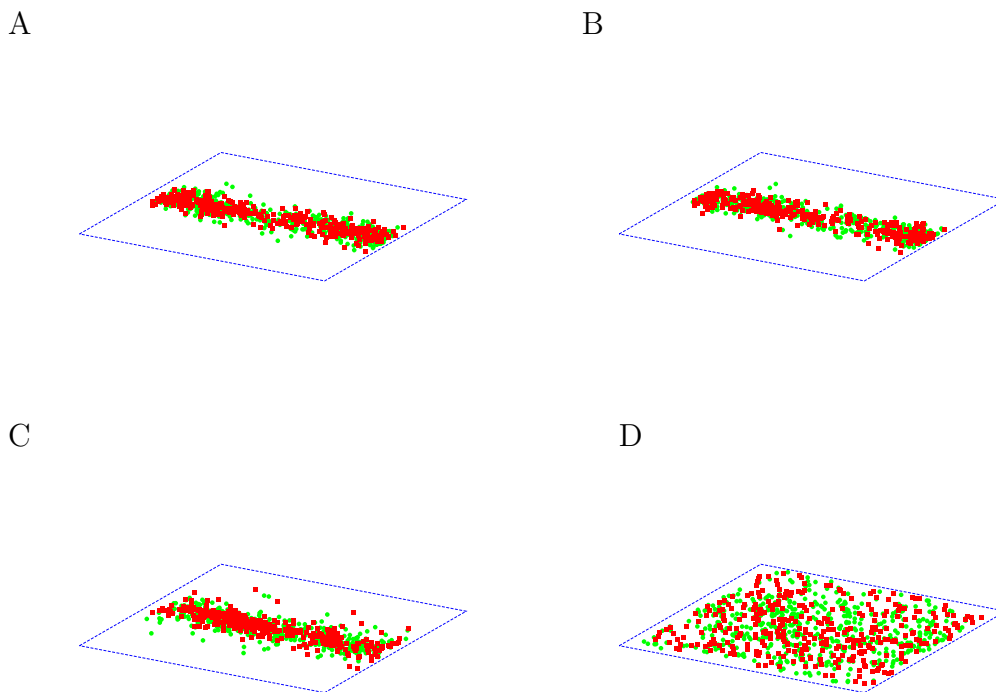


Abbildung 4.26: Spannungs-gepulstes System mit verschiedenen großen Leckleitfähigkeiten nach 8 *sec* Simulationszeit, A: 10^1 pS , B: 10^4 pS , C: 10^5 pS , D: 10^6 pS .

Abb. 4.26 zeigt jeweils die Kanalverteilungen des Systems nach 8 *sec* andauernder Reizung mit der üblichen Spannungspulssequenz (Pulslänge und -pause 10 *msec*) für verschiedene Leckleitfähigkeiten in einem Membranflecken bei homogener Anfangsverteilung von Natrium- und Kaliumkanälen. Der angegebene Wert für die Leckleitfähigkeit bezieht sich auf die gesamte Membran. Leckleitfähigkeiten bis 10^5

pS zeigen wenig Einfluß auf den Selbstorganisationsprozeß (Abb. 4.26 A-C). Eine Leckleitfähigkeit von $10^6 pS$ verhindert einen Selbstorganisationsprozeß auf dieser Längenskala, indem die Ionenströme durch die spannungsabhängigen Kanäle von der Leckleitfähigkeit lokal kurzgeschlossen werden. Somit kommt es nicht mehr zu einer signifikanten Ausbildung des Spaltpotentials. "Nicht signifikant" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Drift aufgrund des Potentialgradienten im Spalt bzgl. der Diffusionsbewegung der Kanäle nicht mehr ins Gewicht fällt. Vergleicht man diesen Wert der Leckleitfähigkeit von $10^6 pS$ mit der maximal auftretenden Gesamtleitfähigkeit der spannungsabhängigen Kanäle, so beträgt der Unterschied 2 Größenordnungen. Es sind maximal ca. 250 der spannungsabhängigen Kanäle gleichzeitig offen (Abb. 4.3), folglich ist die maximal auftretende Gesamtleitfähigkeit spannungsabhängiger Kanäle $250 \cdot 20 = 5 \cdot 10^3 pS$. Eine um 2 Größenordnungen größere Membranleckleitfähigkeit ist nicht zu erwarten, der Selbstorganisationsprozeß ist also stabil gegenüber homogenen Leckleitfähigkeiten.

5 Fluidität und Zytoskelett

Für die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Computersimulationen wurde die Beweglichkeit der Ionenkanäle in zwei Grenzfällen betrachtet. In Abschnitt 4.1 wurden Systeme untersucht, in denen sich die Kanäle nicht bewegen können und in Abschnitt 4.2 Systeme, in denen sich die Kanäle ohne Einschränkung - bis auf die Randbedingungen - mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ bewegen können. Es soll hier betrachtet werden, unter welchen Voraussetzungen diese Annahmen sinnvoll sind. Die Fluidität einer Membran hängt von der Komposition der Membran und der Temperatur (Chapman und Benga 1984) ab. Insbesondere reduziert Cholesterol, das in großen Mengen in der Membran enthalten sein kann, die Fluidität der Membran (Yeagle 1985). Ein Diffusionskoeffizient von $0,1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ ist ein typischer Wert für Biomembranen (Kusumi und Sako 1996).

Die Fluiditätsannahme trifft generell nicht auf alle Biomembranen zu: Dicht unterhalb der Plasmamembran befindet sich in der Regel ein Zytoskelett, welches als Polymernetzwerk ausgebildet wird (Bennett und Lambert 1991, Bennett und Gilligan 1993). Proteine wie Filamin sind dafür verantwortlich, daß sich wirklich ein Netzwerk und keine andere Struktur ausbildet (Bretscher 1991). Dieses Netzwerk trägt zur mechanischen Stabilität der Zelle bei. Mittels sogenannter Ankyrine können Membranproteine an das Netzwerk binden, wodurch die Diffusion der Proteine reduziert wird (Pumplin und Bloch 1993). Durch die Kopplungsmöglichkeiten an das Aktinnetzwerk wird die Membran in einzelne Bereiche einer Größe zwischen $0,1$ und $1 \mu\text{m}^2$ unterteilt, innerhalb derer die Membran fluide ist. (Kusumi *et al.* 1993, Kusumi und Sako 1996). In diesen Domänen können Membranproteine lateral mit dem oben angegebenen Diffusionskoeffizienten diffundieren und unter Umständen Cluster bilden (Gumbiner und Louvard 1985, Jacobson und Vaz 1992, Edidin 1992, Kusumi und Sako 1996). Typischerweise halten sich Membranproteine 25 sec in einer solchen Domäne auf (abhängig von der Domänengröße) und "hüpfen" dann in eine benachbarte Domäne (Kusumi und Sako 1996). Auf diese Weise ergibt sich auf Längenskalen größer der einer Domäne ein effektiver Diffusionskoeffizient von $0,024 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (Kusumi und Sako 1996, für ein Modell siehe Leitner *et al.* 2000, Brown *et al.* 2000). Die Domänengrenzen innerhalb der Membran können verändert werden, indem das Aktinnetzwerk umgebaut wird. Bei Anwesenheit des Proteins Gelsolin wird bei einer intrazellulären Kalziumkonzentration größer als $10^{-6} M$, die in Zellen nur lokal und transient erreicht wird, das Aktinnetzwerk, welches Gel-Eigenschaften besitzt, aufge-

brochen, sodaß es lokal in die Sol-Phase übergeht und neu wieder aufgebaut werden kann (McLaughlin *et al.* 1993, Matsudaira und Janmey 1988). Durch Umorganisation des Netzwerkes kann über größere Entfernungen hinweg die laterale Proteinbewegung unterstützt werden (Kusumi und Sako 1996).

In den im vorigen Kapitel vorgestellten Computersimulationen wurden Membrangrößen zwischen 0,25 und 1 μm^2 betrachtet. Membranstücke dieser Größe lassen sich als Domänen interpretieren. Damit ist die Fluiditätsannahme plausibel. Für Modelle auf größeren Längenskalen wie z. B. bei Fromherz 1995 (314 μm^2) könnte die Fluiditätsannahme für das gesamte Membranstück problematisch sein.

Auf kurzen Zeitskalen (20 msec) im Vergleich zur lateralen Kanalbewegung (Sekunden) wie sie in Abschnitt 4.1 betrachtet werden, können die Kanäle als fixiert angenommen werden. Zudem gibt es in Biomembranen - zumindest unter bestimmten Vorraussetzungen (z.B. geeignete intrazelluläre Kalziumkonzentration) - Bereiche, in denen die Proteine an das Zytoskelett gebunden sind (Alberts *et al.* 1994, Benke *et al.* 1993).

6 Biomembranen in natürlichem Gewebe

In Kapitel 4 konnte gezeigt werden, daß in einem System mit schmalen Spalt zwischen Biomembran und einer Oberfläche die elektrischen Eigenschaften der Membran von der Ionenkanalverteilung abhängen. Das sich im Spalt zwischen Membran und Oberfläche ausbildende elektrische Potential ist dafür verantwortlich, indem zum einen die treibende Spannung für den Kanalstrom abhängig von Ort und Anzahl der offenen Kanäle ist, zum anderen bei spannungsabhängigen Kanälen die *a priori* voneinander unabhängigen Kanaloffenwahrscheinlichkeiten gekoppelt sind: Geht ein Ionenkanal auf, so ändert der durch ihn fließende Strom das Potential im Spalt lokal und demzufolge die Offenwahrscheinlichkeit für benachbarte Kanäle. Besonders gut zu erkennen ist dieser Effekt in der qualitativ anderen Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen im zentrierten System (Abb. 4.3): Die Kaliumkanäle weisen eine scheinbare Inaktivierung auf.

Ein kollektives Schaltverhalten einer Ionenkanaldichte findet sich auch in einem Modell bei Fromherz (Fromherz 1997), das eine homogene Kanaldichte einer spannungsabhängigen Leitfähigkeit dicht an einer Oberfläche beschreibt. Das Potential im schmalen Spalt bewirkt auch dort die Kopplung von zunächst unabhängigen Leitfähigkeitseinheiten.

Das zeitliche Integral über den Strom eines Systems mit zentrierten Kanalverteilungen (Abb. 4.2 A) im Abstand von 10 nm zu einer Oberfläche ist deutlich geringer als die eines Systems im Abstand von 100 nm. Die maximale Stromamplitude unterscheidet sich nur wenig. Folglich ist es bei einem Abstand von 10 nm möglich, mit relativ wenig Ionenstrom über die Membran einen vergleichbaren Maximalstrom zu bewirken. Dies ist für die Zelle energetisch günstig, weil entsprechend wenig Energie für Ionenpumpen aufgewandt werden muß, um die Ionengradienten über der Membran aufrecht zu erhalten.

In Abschnitt 4.3 wurde gezeigt, daß ein durch eine Sequenz von Spannungspulsen angetriebenes Membranstück, das spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle enthält, ein Selbstorganisationsverhalten bzgl. der Kanaldichte innerhalb weniger Sekunden aufweist.

Toth und Crunelli haben in Simulationen eines ähnlichen Systems beobachtet,

daß die Verteilungen von Natrium- und Kaliumkanälen auf dem Dendriten *spike*-Rate und -Form nachhaltig beeinflussen (Toth und Crunelli 1998).

Falls sich reizabhängig die Kanaldichte auf einem Dendriten ändert, wie es in Kapitel 4 beschrieben wurde (Abb. 4.14), und damit auch das elektrische Verhalten, schlägt sich das im *voltage clamp* in der veränderten Stromantwort (Abb. 4.15) und im *current clamp* in der veränderten *spike*-Rate (Toth und Crunelli 1998) nieder.

Nach Experimenten von Young und Poo ist es möglich, mittels eines von außen lateral an die Membran angelegten vergleichsweise schwachen elektrischen Feldes, ACh-Rezeptoren zu clustern (Young und Poo 1983). Der Clusterungsprozeß spielt sich auf einer Zeitskala von Stunden ab. Das angelegte elektrische Feld beträgt nur 2-3 V/cm d.h. 0,2-0,3 mV/ μ m. Wie gezeigt wurde, ändert sich bei den hier vorgestellten Simulationsergebnissen das laterale elektrische Feld um bis zu 35 mV auf 1/4 μ m (Abb. 4.8), was den Clusterungsprozeß beschleunigt. Zusätzlich kann der effektive Diffusionskoeffizient der ACh-Rezeptoren durch das Überwinden von Domänengrenzen verlangsamt sein (Leitner *et al.* 2000).

Damit ist gezeigt, daß die gerichtete laterale Bewegung von Proteinen in einer Biomembran aufgrund eines elektrischen Feldgradienten über größere Distanzen möglich ist. Allerdings sind die ACh-Rezeptorcluster nach Abschalten des elektrischen Feldes über mehrere Stunden stabil, was darauf hinweist, daß eine zusätzliche bindende Kraft die Diffusionsbewegung der Kanäle verzögert. So eine Kraft könnte als Bindung an das Zytoskelett oder als Bindung der Rezeptoren untereinander interpretiert werden.

Bei der Simulation eines Spannungs-stimulierten Röhrensegments (Abschnitt 4.5), welches sich z. B. als myelinisiertes Axon interpretieren läßt, bilden die Ionenkanäle zunächst einen Ring um die Mitte des Axonsegments, der nach ca. 12 sek in einen elliptischen Fleck kollabiert (Abb. 4.17). Dieser Kollaps wird vermutlich durch räumliche Dichtefluktuationen innerhalb des Ringes ausgelöst, da von der Symmetrie des Systems her das Ringmuster stabil sein sollte. Ein Modell, das keine einzelnen Kanäle, sondern Kanaldichten beschreibt und mit einer homogenen Anfangskanalverteilung startet (wie z. B. Fromherz 1997), würde bei gleicher Geometrie vermutlich die Bandstruktur als Endmuster besitzen, da diese räumlichen Dichtefluktuationen nicht berücksichtigt werden.

In der Nähe von *gap junctions* nähern sich die Membranen benachbarter Zellen auf 2 bis 4 nm an (Zigmond *et al.* 1999). Die in Abschnitt 4.3 beschriebene Bewegung von Ionenkanälen führt zu einer einander gegenüber liegenden Sammlung der Kanäle in den beiden Membranen. Dies könnte ein Hinweis auf einen Mechanismus sein, der bei der Ausbildung von *gap junctions* eine Rolle spielt.

Selbstorganisationsphänomene wie sie in Abschnitt 4.3 und 4.4 beschrieben sind kosten die Zelle keine zusätzliche freie Energie für den Transport der Kanäle zu ihren

Zielorten. Weiterhin ist es nicht notwendig, Speicherplatz in der Erbinformation mit Zielkoordinaten zu belegen. Somit wäre ein solches Verfahren für eine Zelle relativ "wirtschaftlich".

7 Biomembranen an künstlichen Oberflächen

Es besteht wachsendes Interesse daran, funktionelle Beziehungen zwischen Nervenzellen und künstlichen Oberflächen herzustellen. Zu diesem Zweck läßt man Zellen z. B. auf einer Siliziumoxid-Schicht aufwachsen, um sie dann kapazitiv über den Spalt zwischen Halbleiter und Zelle zu stimulieren (Fromherz und Stett 1995, Ulbrich und Fromherz 2000). Der Abstand zwischen Zelle und Oberfläche kann durch eine zusätzliche Beschichtung variiert werden. Ohne zusätzliche Beschichtung beträgt der Abstand zwischen Zellmembran und Siliziumchip 1 nm , bei einer Beschichtung mit Albumin 50 nm (Rädler *et al.* 1995) und bei einer Beschichtung mit Laminin 110 nm (Zeck und Fromherz 2000). Selbst bei einem Abstand von nur 1 nm ist die der Oberfläche zugewandte Zellmembran fluide, wenngleich der Diffusionskoeffizient für Proteine um den Faktor 2-3 kleiner ist als in der "freien" Membran, bzw. anomale Diffusion vorliegt (Kottig und Fromherz 2000).

Für die Interpretation von Messungen an derartigen Systemen ist, wie in Kapitel 4 gezeigt werden konnte, eine Berücksichtigung der Ionenkanalverteilung in der Zellmembran möglicherweise notwendig. Da die Zellmembran fluide ist, müssen auch zeitlich veränderliche Ionenkanaldichten, wie sie als Selbstorganisationsprozesse in Abschnitt 4.3 und 4.4 beschrieben wurden, in Betracht gezogen werden. Einen Hinweis darauf geben Experimente von Straub und Fromherz (Straub und Fromherz 2000): Spannungsabhängige Kaliumkanäle, die Spannungspulsen ausgesetzt sind, lassen sich als Cluster in der der Oberfläche zugewandten Zellmembran auffinden. Die Dynamik der Clusterbildung konnte dabei nicht beobachtet werden.

In künftig möglicherweise erstellbaren Netzwerken aus Nervenzellen und Halbleitern bestünde nach den Ergebnissen der hier vorgestellten Computersimulationen die Möglichkeit, durch Stimulation getriebene Veränderungen in Ionenkanaldichten und damit Veränderungen im Übertragungsverhalten auszunutzen, um die Häufigkeit in der Benutzung eines Übertragungsweges, die in der Form des übertragenen Signals codiert ist, im System zu speichern.

8 CA3-Synapsen

Wie in Kapitel 1 bereits erläutert, gibt es zwei LTP-Hypothesen: Die homosynaptische LTP zeigt sich in der verstärkten Antwort einer zuvor tetanisch gereizten Synapse, die heterosynaptische LTP in der Verstärkung einer Synapse, deren Postsynapse durch Aktivität des Dendriten bereits depolarisiert ist, während gleichzeitig die Präsynapse erregt wird.

Untersuchungen unter Zuhilfenahme optischer Methoden zeigen, daß nach kurzem, tetanischen Stimulus AMPA-Kanäle an den Schäften von Dendriten und in kurzen Fortsätzen (*spines*) clustern. Dabei kommt es zur Clusterung in Fortsätzen, die bereits AMPA-Kanäle enthielten, also vermutlich bereits funktionale Synapsen waren, und in Fortsätzen, die bis dahin keine AMPA-Kanäle enthielten (Shi *et al.* 1999). Die Clusterung wurde weder in Abwesenheit tetanischer Stimulation gesehen, noch, wenn die NMDA-Rezeptoren in ihrer Funktion behindert wurden. Die Autoren interpretieren die zunächst AMPA-Kanal freien Fortsätze als schweigende Synapsen. Sie vermuten, daß der Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren ein Signal ist, in schweigenden Synapsen AMPA-Kanäle auszubilden oder zu rekrutieren und somit die schweigende Synapse in eine funktionale Synapse umzuwandeln.

In Abschnitt 4.3 konnte im Modell gezeigt werden, daß sich in einem synaptischen Spalt durch das Öffnen der AMPA-Kanäle auf einen Neurotransmitterpuls hin ein räumlich und zeitlich veränderliches Potential ausbildet. Für NMDA-Kanäle, die sich in der Mitte der postsynaptischen Dichte befinden, reicht diese Depolarisation bereits aus, um den Magnesiumblock soweit zu entfernen, daß ein beträchtlicher Anteil des maximal möglichen NMDA-Stromes fließt (Abb. 2.5 B und 4.12). Das bedeutet, daß NMDA-Kanäle in funktionalen Synapsen keine Detektoren für eine gleichzeitige prä- und postsynaptische Erregung sein können. Falls, wie Shi *et al.* (Shi *et al.* 1999) vermuten, der Kalziumeinstrom durch NMDA-Kanäle die Akkumulation von AMPA-Kanälen triggert, so würden die NMDA-Kanäle in funktionalen Synapsen homosynaptische LTP bewirken, da die postsynaptische Depolarisation aufgrund der AMPA-Kanalaktivierung bereits ausreicht, den Magnesiumblock der NMDA-Kanäle zu entfernen.

In schweigenden Synapsen könnten NMDA-Kanäle gleichzeitige prä- und postsynaptische Erregung wahrnehmen, da keine AMPA-Kanäle vorhanden sind, die schon aufgrund einer präsynaptischen Reizung eine Depolarisation der Postsynapse bewirken können. Somit wäre hier heterosynaptische LTP gegeben.

9 Zusammenfassung und Ausblick

9.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Computersimulationen an einer Modellmembran, die Ionenkanäle enthält, in der Nähe einer Grenzfläche vorgestellt. Es zeigte sich, daß die Ionenkanalverteilung auf der Membran die Stromantwort des Systems auf einen Spannungspuls insbesondere in ihrer Form, deutlich beeinflußt. Ein durch Spannungspulse angetriebenes mobiles System wies in unterschiedlichen Geometrien ein gegenüber Leckleitfähigkeiten stabiles Selbstorganisationsverhalten auf. Schließlich wurde an einem Synapsenmodell homosynaptische und heterosynaptische LTP diskutiert.

9.2 Meßtechnik

9.2.1 Patch-Clamp-Technik

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse von Simulationen lassen sich durch unterschiedliche Meßverfahren überprüfen: Die Ionenkanäle können mit Hilfe optischer Methoden, beispielsweise mit Hilfe der Fluoreszenzcorrelationsspektroskopie (FCS), beobachtet werden (s. u.), oder die elektrischen Membraneigenschaften können in einem *Patch-Clamp*-Experiment untersucht werden. Nach den Ergebnissen aus Kapitel 4 sollte ein Membranfleck dicht an einer Oberfläche eine andere Stromantwort auf einen Spannungspuls hin liefern als einer, der weit davon entfernt ist. Ein fluider Membranpatch, der spannungsabhängige Kanäle enthält, sich dicht an einer Oberfläche befindet und von einer Spannungspulsfolge angeregt wird, sollte seine Stromantwort innerhalb weniger Sekunden verändern. Durch ein solches Experiment ließe sich ein Rückschluß auf Vorzeichen und Größe der elektrophoretischen Ladung der betrachteten Ionenkanäle ziehen, insbesondere könnte das Experiment in Badlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden, um die elektrophoretischen Ladungen zu beeinflussen. Ferner könnte man ausgehend von der Größe des gemessenen Effektes ein Urteil darüber fällen, bei welcher Art von Messungen die spezielle Geometrie des Systems bei der Interpretation der Meßdaten herangezogen werden muß.

9.2.2 Fluoreszenzcorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzcorrelationsspektroskopie (FCS) ermöglicht es, einzelne Moleküle in kleinen Volumina zu detektieren (Widengren und Rigler 1998). FCS basiert auf der Analyse von Intensitätsschwankungen von fluoreszierenden Partikeln, die von einer konstanten Lichtquelle angeregt werden. Diese Technik ermöglicht es, einzelne Moleküle auch in Biomembranen zu beobachten (Widengren und Rigler 1998, Schwille *et al.* 1999). Die Experimente können bei Raumtemperatur durchgeführt werden, sodaß dynamische Phänomene untersucht werden können, anders als bei der Elektronenmikroskopie, bei der zuvor das zu untersuchende Präparat eingefroren werden muß.

So sollte es möglich sein, unter geeigneten experimentellen Bedingungen die in dieser Arbeit vorhergesagten Selbstorganisationsphänomene von Ionenkanälen mit Hilfe der FCS-Methode zu beobachten.

9.3 Modellerweiterung

Aufgrund seiner einfachen Struktur ist das Modell gut erweiterbar. Es können weitere Kanäle mit speziellen Schalteigenschaften eingeführt werden, es lassen sich für die Kanalsorten unterschiedliche Diffusionskonstanten und elektrophoretische Ladungen betrachten. Bei Ladungen mit verschiedenem Vorzeichen würden die Ionenkanäle in unterschiedliche Richtungen driften.

Möchte man größere Membranflächen betrachten, so ist es erforderlich ein Zytoskelett einzuführen, das die Membran in Domänen teilt. Dieses läßt sich realisieren, indem man in der Modellmembran Regionen definiert, an denen die Kanäle mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit reflektiert werden, bzw. in denen sie für eine mittlere Zeit ankern können, ähnlich wie es bei Leitner *et al.* 2000 bzw. Brown *et al.* 2000 beschrieben wird. Beim Ankoppeln an das Zytoskelett könnte zusätzlich der Schaltzustand des Ionenkanals beeinflußt werden (Fromherz und Zimmermann 1995), wie es beispielsweise an spannungsabhängigen Natriumkanälen gemessen wurde (Shcherbatko *et al.* 1999).

Arbeiten von Fromherz weisen darauf hin, daß eine homogen verteilte Leckleitfähigkeit bestimmter Größe, wie sie am Ende von Kapitel 4 eingeführt wurde, auf größeren Längenskalen periodische Muster erzeugen könnte (Fromherz und Zimmermann 1999, Fromherz und Kaiser 1991).

10 Literatur

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson. 1994 Molecular biology of the cell. 3rd ed. Garland Publishing.

Anderson, O. S. 1978. Permeability properties of unmodified lipid bilayer membranes. In Membrane Transport in Biology (G. Giebisch, D. C. Tosteson, H. H. Ussing, eds.) Vol. 1, pp. 369-446. New York: Springer Verlag.

Benke, T. A., O. T. Jones, G. L. Collingridge, and K. J. Angelides. 1993. N-Methyl-D-aspartate receptors are clustered and immobilized on dendrites of living cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7819-7823.

Bennett, V. and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane structure and micron scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:27-66.

Bennett, V. and S. Lambert. 1991. The spectrin skeleton: from red cells to brain. *J. Clin. Invest.* 87:1483-1489.

Binding, V. 1997. Biophysikalische Untersuchung von Ionenleitfähigkeiten im dendritischen Knöpfchen von olfaktorischen Rezeptorzellen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*). Diplomarbeit.

Bliss, T. V. P., and G. L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Bowe, M. A., and J. R. Fallon. 1995. The role of agrin in synapse formation *Annu. Rev. Neurosci.* 18:443-462.

Bretscher, A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:337-374.

Brown, D. A., and E. London. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* 164:103-114.

Brown, F. L. H., D. M. Leitner, J. A. McCammon, and K. R. Wilson. 2000. Lateral diffusion of membrane proteins in the presence of static and dynamic corrals: Suggestion for

appropriate observables. *Biophys. J.* 78:2257-2269.

Chapman, D. and G. Benga. 1984. Biomembrane fluidity - studies of model and natural membranes. In *Biological Membranes* (D. Chapman, ed.), Vol.5, pp. 1-56. London: Academic Press.

Clements, J. D., R. A. J. Lester, G. Tong, C. E. Jahr, and G. L. Westbrook. 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* 258:1498-1501.

Cross, M. C., and P. C. Hohenberg. 1993. Pattern formation outside of equilibrium. *Reviews of Modern Physics* 65:851-1112.

Denet, B., and P. Pelce. 1994. Ionic currents generated by voltage-dependent channels. *Europhys. Lett.* 25:265-269.

Eddidin, M. 1992. Patches, posts and fences: proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol.* 2:376-380.

Edwards, F. A. 1995. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation. *Physiol. Rev.* 75:749-787.

Elinder, F., and P. Arhem. 1999. Role of individual surface charges of voltage-gated K channels. *Biophys. J.* 77:1358-1362.

Engert, F., and T. Bonhoeffer. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.

Ferns, M., M. Deimer, and Z. W. Hall. 1996. Agrin induced acetylcholin receptor clustering in mammalian muscle requires tyrosine phosphorylation. *J. Cell Biol.* 132:937-944.

Ferns, M., J. T. Campanelli, W. Hoch, R. Scheller, and Z. W. Hall. 1993. The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron* 11:491-502

Ferns, M., W. Hoch, J. T. Campanelli, F. Rupp, Z. W. Hall, and R. H. Scheller. 1992. RNA splicing regulates agrin-mediated acetylcholin receptor clustering activity on cultured myotubes. *Neuron* 8: 1079-1086.

Fromherz, P., and A. Stett. 1995. Silicon-neuron junction: Capacitive stimulation of an individual neuron on a silicon chip. *Phys. Rev. Lett.* 75:1670-1673.

Fromherz, P., and W. Zimmermann. 1995. Stable spatially periodic patterns of ion channel in biomembranes. *Phys. rev. E* 51:1659-1662.

- Fromherz, P., and A. Zeiler. 1994. Dissipative condensation of ion channels described by a Langevin-Kelvin equation. *Physics Letters A* 190:33-37
- Fromherz, P., and B. Kaiser. 1991. Stationary patterns in membranes by nonlinear diffusion of ion channels. *Europhys. Lett.* 15:313-318
- Fromherz, P. 1989. Dissipative spinodal condensation of membrane proteins. *Chem. Phys. Lett.* 154:146-150.
- Fromherz, P. 1988a. Dissipative structures of ion channels in the fluid mosaic model of a membrane cable. *Phys. Chem.* 92:1010-1016.
- Fromherz, P. 1995. Self-focusing of ion channels in cell adhesion. *Phys. Rev. E* 52:R1303-R1305.
- Fromherz, P. 1997. Self-gating of ion channels in cell adhesion. *Phys. Rev. Lett.* 78:4131-4134.
- Fromherz, P. 1988b. Spatio-temporal patterns in the fluid-mosaic model of membranes. *Bioch. et Biophys. Acta.* 944:108-111.
- Gautam, M., P. G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R. H. Scheller, J. P. Merlie, and J. R. Sanes. 1996. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell (Cambridge, Mass.)* 85:525-535
- Gumbiner, B. and D. Louvard. 1993. Glycoprotein mobility and dynamic domains in fluid plasma membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:417-431.
- Hall, Z. W. 1992. An introduction to molecular neurobiology. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F.J. Sigworth. 1981 Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391:85-100.
- Hille, B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hodgkin, A. L., and A. F. Huxley. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London.)* 117:500-544.
- Huguenard, J. R., and D. A. McCormick. 1992. Simulations of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J. Neurophys.* 68:1373-1383.
- Isaac, J. T., R. A. Nicoll, R. C. Malenka. 1995. Evidence for silent synapses: implications

for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-434.

Jacobsen, K. and W. L. C. Vaz. 1992. Domains in biological membranes. *Comm. Mol. Cell Biophys.* 8:1-114.

Jahr, C. E., and C. F. Stevens. 1990. Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single channel kinetics. *J. Neurosci.* 10:3178-3182.

Jahr, C. E., and C. F. Stevens. 1990. A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behaviour. *J. Neuroscience* 10:1830-1837.

Jonas, P., G. Major, and B. Sakmann. 1993. Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fiber synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* 472:615-663.

Jung, A., F. W. Lischka, J. Engel, and D. Schild. 1994. Sodium/calcium exchanger in olfactory receptor neurones of *Xenopus laevis*. *NeuroReport* 5:1741-1744.

Kloeden, P. E., Platen, E., and H. Schurz. 1991. Numerical solution of SDE through computer experiments. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Kottig, K., and P. Fromherz. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy of giant vesicles on oxidized silicon. *European Biophys. J.* 29:298.

Kusumi, A., and Y. Sako. 1996. Cell surface organisation by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:566-574.

Kusumi, A., Y. Sako, and M. Yamamoto. 1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* 65:2021-2040.

Larter, R., and P. Ortoleva 1982. A study of instability to electrical symmetry breaking in unicellular systems. *J. theor. Biol.* 96:175-200.

Larter, R., and P. Ortoleva. 1981. A theoretical basis for self-electrophoresis. *J. theor. biol.* 88:599-630.

Leitner, D. M., F. L. H. Brown, and K. R. Wilson. 2000. Regulation of protein mobility in cell membranes: A dynamic corral model. *Biophys. J.* 78:125-135.

Lucas, W. J. 1975. *J. exp. Bot.* 26, 243

Malenka, R. C., and R. A. Nicoll. 1997. Silent synapses speak up. *Neuron* 19:473-476.

Malinow, R., Z. F. Mainen, and Y. Hayashi. 2000. Ltp mechanism: from silence to for-lane

- traffic. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:352-357.
- Matsudaira, P., and P. Janmey. 1988. Peaces in the actin severing protein puzzle. *Cell* 54:139-140.
- McCormick, D. A., and J. R. Huguenard. 1992. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J. Neurophysiol.* 68:1384-1400.
- McLaughlin, P. J., J. T. Gooch, H.-G. Mannherz and A. G. Weeds. 1993. Structure of gel-solin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364:685-692.
- Murray, J. D. 1993, *Mathematical biology*. 2nd ed. Springer Verlag.
- Nakanishi, S. 1994. Metabotropic glutamate receptors: Synaptic transmission modulation, and plasticity. *Neuron* 13:1031-1037.
- Neher E., and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci Am* 266:28-35.
- Nicoll, R. A., and R. C. Malenka. 1995. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118.
- Nicholls, J. G., A. R. Martin, B. G. Wallace. 1992. *From neuron to brain*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Nygren, A., and J.A. Halter. 1999. A general approach to modeling conduction and concentration dynamics in excitable cells of concentric cylindrical geometry. *J. theor. Biol.* 199:329-358.
- Pelce, P. 1993. Origin of cellular ionic currents. *Phys. Rev. Lett.* 71: 1107-110.
- Press, W. H., S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery. 1996, *Numerical recipes in C*. 2nd ed. Cambridge University Press.
- Pumplin, D. W. and R. J. Bloch. 1993. The membrane skeleton. *Trends Cell Biol.* 3:113-117.
- Rädler, J. O. *et al.* 1995. *Phys. Rev. E* 51:4526.
- Ruegg, M. A., K. W. K. Tsim, S. E. Horton, G. Escher, E. M. Gensch and U. J. McMahan. 1992. The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron* 8:691-699.
- Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *science* 256:503-512.

-
- Savtchenko, L. P., S. N. Antropov, and S. M. Korogod. 2000. Effect of voltage drop within the synaptic cleft on the current and voltage generated at a single synapse. *Biophys. J.* 78:1119-1125.
- Schild, D., A. Jung, and H. A. Schultens. 1994. Localization of calcium entry through calcium channels in olfactory receptor neurons using a laser scanning microscope and the calcium indicator dyes Fluo-3 and Fura-Red. *Cell Calcium* 15:341-348.
- Schild, D., and F. W. Lischka. 1994. Amiloride-insensitive cation conductance in *Xenopus laevis* olfactory neurons: A combined patch clamp and calcium imaging analysis. *Biophys. J.* 66:299-304.
- Schwille, P., J. Koriach, and W. W. Webb. 1999. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometrie* 36:176-182.
- Shcherbatko, A., F. Ono, G. Mandel, and P. Brehm. 1999. Voltage-dependent sodium channel function is regulated through membrane mechanics. *Biophys. J.* 77:1945-1959.
- Shi, S.-H., Y. Hayashi, R. S. Petralia, S. H. Zaman, R. J. Wenthold, K. Svoboda, and R. Malinow. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
- Straub, B., and P. Fromherz. 2000. Accumulation of recombinant potassium channels in cell adhesion probed by transistor. *European Biophys. J.* 29:348.
- Toko, K., H. Chosa, and K. Yamafuji. 1985. Dissipative structure in the *Characeae*: Spatial pattern of proton flux as a dissipative structure in Characean cells. *J. theor. Biol.* 114:125-175.
- Toth, T. I., and V. Crunelli. 1998. Effects of tapering geometry and inhomogeneous ion channel distribution in a neuron model. *J. Neurosci.* 84:1223-32.
- Trommershäuser, J., J. Marienhagen, and A. Zippelius. 1999. Stochastic model of central synapses: slow diffusion of transmitter interacting with spatially distributed receptors and transporters. *J. Theor. Biol.* 198:101-120.
- Turing, A. M. 1952. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser.* 237:37.
- Ulbrich, M., and P. Fromherz. 2000. Controlling ion channels on silicon chips by capacitive transients. *European Biophys. J.* 29:348.
- Walmsley, B., F. J. Alvarez, and R. W. Fyffe. 1998. Diversity of structure and function at mammalian central synapses. *Trends Neurosci.* 21:81-88
- Widengren, J., and R. Rigler. 1998. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to in-

investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell. mol. Biol.* 44:857-879.

Yeagle, P. L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 822:267-287.

Young, S. H., and M. Poo. 1983. Topographical rearrangement of acetylcholine receptors alters channel kinetics. *Nature* 304:161-163.

Zigmond, J. M., F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts, L. R. Squire. 1999 Fundamental neuroscience. Academic Press.

Zucker, R. S., and P. G. Haydon. 1988. Membran potential has not direct role in avoking neurotransmitter release. *Nature* 335:360-362.

DANK

An dieser Stelle danke ich allen sehr herzlich, die in vielfältiger Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Prof. Reiner Kree, der meine Arbeit betreut hat, für intensive Diskussionen zur Verfügung stand und mir in der Anfertigung der Arbeit und bzgl. meines Arbeitsstils viel Freiheit gelassen hat.

Gisela Meseke, Prof. Annette Zippelius, Prof. Reiner Kree und anderen Villabewohnern danke ich für das gute Arbeitsklima.

Das Graduiertenkolleg “Organisation und Dynamik neuronaler Netzwerke” hat mich mit einem Stipendium während der Promotionszeit unterstützt. Hier möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Wolf bedanken, dem es immer ein besonderes Anliegen war, den Austausch über die Fächergrenzen hinweg anzuregen.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 8. Juni 1970 als erstes Kind der Eheleute Dr. Horst Binding und Karin Binding in Köln geboren.

Von 1976 bis 1980 besuchte ich die Hardenberggrundschule in Kiel, von 1980 bis 1989 das humanistische Gymnasium "Kieler Gelehrtenschule", welches ich mit dem Abitur abschloß.

Zwischen Oktober 1989 und September 1990 leistete ich meinen Grundwehrdienst in Itzehoe, Seeth und Neumünster ab.

Von Oktober 1990 bis März 1993 habe ich an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Physik studiert, zwischen April 1993 und Oktober 1997 habe ich mein Studium an der Georg-August-Universität Göttingen fortgesetzt und mit dem Diplom abgeschlossen. Die Diplomarbeit trug den Titel "Biophysikalische Untersuchung von Ionenleitfähigkeiten im dendritischen Knöpfchen von olfaktorischen Rezeptorzellen des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*)". Seit März 1991 war ich Stipendiat der "Studienstiftung des Deutschen Volkes".

Seit November 1997 habe ich als Stipendiat des Graduiertenkollegs "Organisation und Dynamik neuronaler Netzwerke" an meiner Dissertation bei Prof. Dr. Reiner Kree im Institut für theoretische Physik gearbeitet.

Meine Staatsangehörigkeit ist deutsch. Seit September 1996 bin ich verheiratet.